

BeschreibungVerwendung von Tetrahydrobiopterinderivaten zur Behandlung und5       Ernährung von Patienten mit Aminosäurestoffwechselstörungen

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Tetrahydrobiopterinderivaten gemäß Anspruch 1, eine Zusammensetzung  
10      gemäß Anspruch 13, eine Verwendung von Tetrahydrobiopterinderivaten als Nahrungsergänzungsmittel gemäß Anspruch 26, eine Spezialnahrung  
gemäß Anspruch 28, ein phenylalaninarmes Spezialnahrungsmittel gemäß Anspruch 40, sowie ein Diagnostikum zur Diagnose von Tetrahydrobiopterin  
–sensitiven Erkrankungen, die mit gestörtem Aminosäurestoffwechsel  
15      einhergehen gemäß Anspruch 43.

Erkrankungen als Folge von Aminosäurestoffwechselstörungen sind in ihrer Gesamtheit relativ weitverbreitete, Erkrankungen die meist genetisch bedingt sind. Als pathophysiologisches Korrelat finden sich verminderte  
20      Aktivitäten bestimmter Enzyme mit der Folge von erhöhten oder erniedrigten Konzentrationen von Aminosäuren und von daraus synthetisierten Neurotransmittern und Botenstoffen sowie gestörter Verträglichkeit (Proteintoleranz) von bestimmten Eiweißkomponenten in der Nahrung.

25      Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung sollen unter dem Begriff "Erkrankungen als Folge eines gestörten Aminosäurestoffwechsels folgende pathophysiologischen Zustände verstanden werden:

30      Zustände mit erhöhtem Phenylalanin oder vermindertem Tyrosin, Serotonin oder Dopamin in Körperflüssigkeiten, Geweben oder Zellen, insbesondere bei Zuständen mit verringelter Phenylalaninhydroxylase-, Tyrosinhydroxylase-, Tryptophanhydroxylase- und NO-Synthaseaktivität. Diese Zustände können – jedoch ohne Einschränkung hierauf – folgende  
35      Krankheitsbilder umfassen: Phenylketonurie, insbesondere milde

Phenylketonurie, klassische Phenylketonurie; Pigmentstörungen der Haut, insbesondere Vitiligo; sowie Zustände bedingt durch verminderte zelluläre Verfügbarkeit von Katecholaminen, insbesondere orthostatische Hypotension (Shy-Drager Syndrom), muskuläre Dystonie; sowie 5 Neurotransmitterstörungen, insbesondere Schizophrenie; Zustände bedingt durch verminderte zelluläre Verfügbarkeit von Dopamin oder Serotonin als Folge von Tyrosinhydroxylase- oder Tryptophanhydroxylasemangel, insbesondere Parkinsonismus, depressive Erkrankungen sowie dystone Bewegungsstörungen, Zustände mit verminderter NO-Synthaseaktivität, 10 insbesondere endotheliale Dysfunktion, mangelnde Infektabwehr.

Eine bekannte Aminosäurestoffwechselstörung, welche auf der fehlenden oder verringerten Metabolisierbarkeit des Phenylalanins beruht, ist die Hyperphenylalaninämie, welche durch einen Mangel an 15 Phenylalaninhydroxylase hervorgerufen wird. Mindestens die Hälfte der betroffenen Patienten manifestieren sich mit milden klinischen Phänotypen. Die im Stand der Technik einzige mögliche Behandlung der meisten Aminosäurestoffwechselerkrankungen, wie beispielsweise der Hyperphenylalaninämie, liegt darin, die Patienten mit einer Diät zu ernähren, 20 die Produkte verwendet, die die durch die spezielle Stoffwechselstörung betroffene Aminosäure nicht enthält bzw. nur in sehr geringen Mengen enthält.

Die Hyperphenylalaninämie war eine der ersten genetischen 25 Störungen, die behandelt werden konnten. In den meisten Fällen wird Hyperphenylalaninämie von einem Phenylalaninhydroxylasemangel verursacht, hervorgerufen durch Mutationen auf dem Phenylalaninhydroxylasegen. Die damit verbundenen Phänotypen reichen in ihrem Schweregrad von der klassischen Phenylketonurie (Online 30 Mendelsche Vererbungslehre beim Menschen Nr. 261600) (Online Mendelian Inheritance in Man number 261600) bis hin zur milden Phenylketonurie und milden Hyperphenylalaninämie. Mindestens die Hälfte der betroffenen Patienten leidet an einem der milderen klinischen Phänotypen. Sowohl Patienten, die an einer klassischen Phenylketonurie

leiden, als auch Patienten, die an einer milden Phenylketonurie leiden, müssen ihr Leben lang auf eine proteinarme Ernährung achten, um neurologischen Folgeerscheinungen vorzubeugen und eine normale kognitive Entwicklung sicherzustellen, wohingegen Patienten mit einer 5 leichten Hyperphenylalaninämie unter Umständen keine Behandlung benötigen. Im Zusammenhang mit der sehr strengen Diät steht das Risiko ernährungsbedingter Mangelerscheinungen und sie stellt eine starke Belastung für die Patienten und deren Familien dar.

10 Eine kausal wirkende Therapie existiert bislang im Stand der Technik nicht, so dass es für die betroffenen Patienten keine andere Möglichkeit gibt, als strenge Diät einzuhalten, wenn sie nicht riskieren wollen, erhebliche Folgeerscheinungen der Aminosäurestoffwechselstörung und der beispielsweise damit verbundenen Hyperphenylalaninämie, zu erleiden. Die 15 neurologischen Folgeerscheinungen umfassen beispielsweise irreversible Schädigungen des Nervensystems und des Gehirns, mentale Retardierung bis hin zum völligen Schwachsinn. Darüber hinaus sind Nierenschäden, Leberschäden und Schädigungen der Sinnesorgane beschrieben.

20 Für die betroffenen Patienten heißt das - am Beispiel der Hyperphenylalaninämie - dass man diese mit einer phenylalaninarmen Kost versorgen muß. Da Phenylalanin ein wichtiger Proteinbaustein, insbesondere in der tierischen Welt ist, ist es naturgemäß schwierig, Patienten mit Aminosäurestoffwechselstörungen - ohne Provokation von 25 unerwünschter und toxischer Phenylalaninerhöhung zu ernähren. Darüber hinaus können ernährungsbedingte Mangelerscheinungen auftreten.

30 Im Stand der Technik wurden hierzu früher Eiweißhydrolysate verwendet, welche aus phenylalaninarmen Proteinen durch saure oder alkalische Hydrolyse hergestellt wurden.

Derartige Produkte hatten einen mehr als üblen Geschmack und waren häufig für die Patienten auf lange Sicht untragbar. Neben diesen 35 Hydrolysaten kamen nur nach entsprechendem diätetischem Konzept streng ausgewählte Speisen, meist vegetarischer Natur, als Ernährung für die betroffenen Patienten in Frage.

Demgegenüber sind die synthetischen Aminosäurenmischungen welche diejenige Aminosäure, die von der Stoffwechselstörung betroffen ist, nicht enthält, bereits eine starke Verbesserung gegenüber den 5 althergebrachten Hydrolysaten.

Phenylalaninfreie Produkte auf dieser Basis sind beispielsweise aus der US 5,393,532 bekannt und werden seither als Spezialnahrung für Hyperphenylalaninämie- und Phenylketonuriepatienten verwendet.

10 Desweiteren ist es aus der WO 98/08402 A1 bekannt, Spezialnahrungsmittel auf Basis von Casein-Glyko-Makropeptiden in Verbindung mit Aminosäuremischungen herzustellen, um Patienten im Bedarfsfalle z.B. phenylalaninfrei ernähren zu können.

15 Geschmacklich stehen derartige Aminosäuremischungen jedoch weit unterhalb des Niveaus der gewöhnlichen Nahrungsmittel.

20 Zusammenfassend ist festzuhalten, dass ein strenger, lebenslang einzuhaltender Diätplan, der auf eine spezielle Aminosäurestoffwechselstörung zugeschnitten ist, eine starke psychosoziale Belastung darstellt und andere Behandlungsmethoden bisher nicht erfolgreich waren.

25 Ausgehend von diesem Stand der Technik ist es daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Stoffe zur Verfügung zu stellen, welche einerseits im Rahmen einer therapeutischen Behandlung von Aminosäurestoffwechselstörungen eingesetzt werden können und andererseits zur Herstellung von Nahrungs-Mitteln, insbesondere diätetische 30 Spezialnahrung für von Aminosäurestoffwechselstörungen betroffenen Patienten verwendet werden können.

35 Die obige Aufgabe wird durch eine Verwendung von Tetrahydrobiopterinderivaten gemäß Anspruch 1, eine Zusammensetzung gemäß Anspruch 13, eine Verwendung von Tetrahydrobiopterinderivaten als Nahrungsergänzungsmittel gemäß Anspruch 26, eine Spezialnahrung

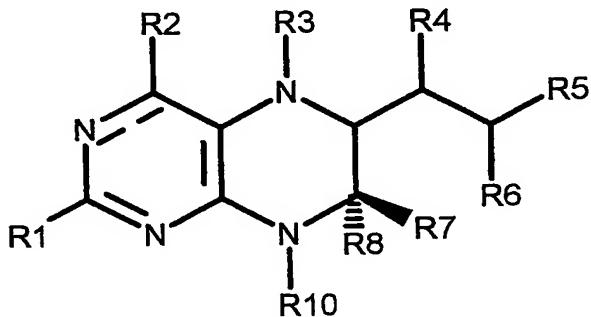
gemäß Anspruch 28 sowie ein phenylalaninarmes Spezialnahrungsmittel gemäß Anspruch 40 gelöst.

Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein  
5 Diagnostikum für solche Aminosäurestoffwechselstörungen zur Verfügung zu stellen, die durch Tetrahydrobiopterinderivate günstig beeinflusst werden können.

Diese Aufgabe wird durch ein Diagnostikum gemäß Anspruch 43  
10 gelöst.

Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung wenigstens einer Verbindung mit folgender allgemeiner Formel:

15



worin R1 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH,  
F, Cl, Br, I, NH<sub>2</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub>; NH-Acyl, wobei der Acylrest 1  
20 bis 32 Kohlenstoffatome enthält, insbesondere CH<sub>3</sub>O, bevorzugt 9 bis 32, vorzugsweise 9 bis 20 Kohlenstoffatome, enthält;

worin R2 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, O, S;

25 worin R3 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>;

worin R4 und R6 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, Acetyl, OX, wobei X ein

C1 bis C32 Acylrest, insbesondere ein C9 bis C32 Acylrest, bevorzugt ein C9 bis C20 Acylrest, ist;

worin R5 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: Phenyl, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl, Isobutyl, t-Butyl;

5 worin R7 und R8 unabhängig voneinander ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, CH<sub>3</sub>, COOH, CHO, COOR<sub>9</sub>, wobei R9 CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl ist;

worin R10 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, und - - eine optionale Doppelbindung darstellt; sowie

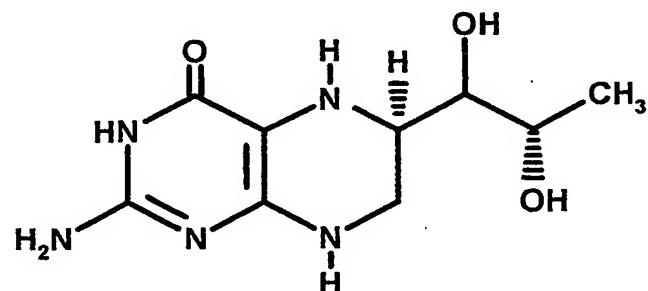
10

deren pharmazeutisch akzeptablen Salze;

zur Herstellung eines Medikamentes zur Verbesserung der Proteintoleranz zur Behandlung von Erkrankungen als Folge eines gestörten 15 Aminosäurestoffwechsels.

Im Folgenden sind bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verwendung beschrieben:

20 Besonders für die erfindungsgemäße Verwendung geeignet ist eine Verbindung, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin, Sapropterin, insbesondere dessen Hydrochlorid oder Sulfat, sowie einer Verbindung mit folgender Struktur:



25

(--(1'R,2'S,6R)-2-Amino-6-(1',2'-dihydroxypropyl)-5,6,7,8-tetrahydro-  
4(3H)-pteridinon,

insbesondere dessen Dihydrochlorid; und/oder

- 5        2-N-Stearoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
2-N-Decanoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
2-N-Palmitoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
2-N-Linoleoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin.

10

Als Salze kommen insbesondere Hydrochloride oder Sulfate zum Einsatz.

- Die oben genannten Verbindungen kommen insbesondere als  
15 Medikament zur Behandlung folgender Erkrankungen bzw.  
Aminosäurestoffwechselstörungen in Frage:

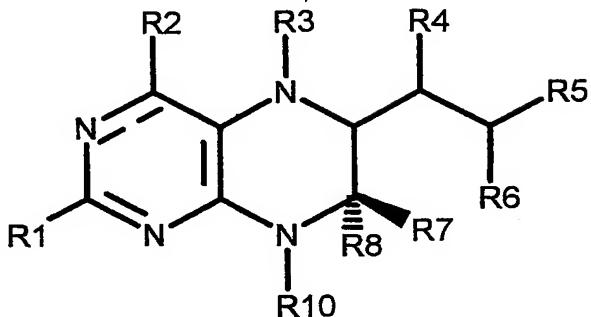
Zustände mit erhöhtem Phenylalanin oder verminderter Tyrosin in  
Körperflüssigkeiten, Geweben oder Zellen, insbesondere Zustände mit  
verringerter Phenylalaninhydroxylaseaktivität; Phenylketonurie,  
20 insbesondere milde Phenylketonurie, klassische Phenylketonurie;  
Pigmentstörungen der Haut, insbesondere Vitiligo; Zustände bedingt durch  
verminderte zelluläre Verfügbarkeit von Katecholaminen, insbesondere  
orthostatische Hypotension (Shy-Drager Syndrom), muskuläre Dystonie;  
sowie Neurotransmitterstörungen, insbesondere Schizophrenie.

25

Vorzugsweise wird als pharmazeutisch akzeptables Salz ein  
Hydrochlorid, insbesondere ein Dihydrochlorid, verwendet.

Darüber hinaus kommt der vorliegenden Erfindung Bedeutung zu,  
30 indem man wenigstens eine Verbindung mit folgender allgemeinen Formel

als Chaperon, insbesondere chemisches Chaperon, oder sogenanntes Protein-Faltungshilfsmittel einsetzt:



5

worin R1 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH,  
F, Cl, Br, I, NH<sub>2</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub>; NH-Acyl, wobei der Acylrest 1  
bis 32 Kohlenstoffatome enthält, insbesondere CH<sub>3</sub>O, bevorzugt 9 bis 32,  
10 vorzugsweise 9 bis 20 Kohlenstoffatome, enthält;

worin R2 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH,  
NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, O, S;

worin R3 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>,  
C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>;

worin R4 und R6 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der  
Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, Acetyl, OX, wobei X ein  
C1 bis C32 Acylrest, insbesondere ein C9 bis C32 Acylrest, bevorzugt ein  
C9 bis C20 Acylrest, ist;

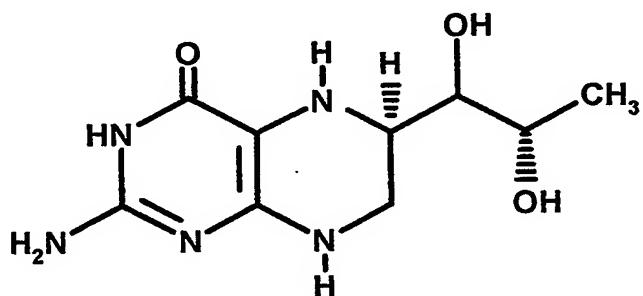
worin R5 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: Phenyl, CH<sub>3</sub>,  
C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl, Isobutyl, t-Butyl;

worin R7 und R8 unabhängig voneinander ausgewählt wird aus der  
Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, CH<sub>3</sub>, COOH, CHO,  
COOR9, wobei R9 CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl ist;

worin R10 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>,  
C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, und - - eine optionale Doppelbindung darstellt; sowie

deren pharmazeutisch akzeptablen Salze.

Auch bei Verwendung als Chaperon ist es bevorzugt, dass die  
 5 Verbindung ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin, Sapropterin, insbesondere dessen Hydrochlorid, sowie einer Verbindung mit folgender Struktur:



10

(-)-(1'R,2'S,6R)-2-Amino-6-(1',2'-dihydroxypropyl)-5,6,7,8-tetrahydro-4(3H)-pteridinone,

insbesondere dessen Dihydrochlorid oder Sulfat und/oder  
 15 2-N-Stearoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
 2-N-Decanoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
 2-N-Palmitoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
 2-N-Linoleoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin.

20 Die genannten Verbindungen haben sich als hervorragend geeignet zur Abminderung von Proteinmißfaltung und dadurch zur Verbesserung von Enzymaktivität, insbesondere bei Strukturanomalien in Enzymen, die Tetrahydrobiopterin als Cofaktor benötigen, beispielsweise bei Defekten der Phenylalaninhydroxylase, herausgestellt. Durch diesen Wirkmechanismus sind sie bevorzugt geeignet zur Herstellung von Arzneimitteln, die zur Behandlung von Krankheitsbildern geeignet sind welche auf  
 25

Strukturanomalien der folgenden Enzyme zurückzuführen sind:  
Phenylalaninhydroxylase, Tyrosinhydroxylase, Tryptophanhydroxylase, oder  
NO-Synthase.

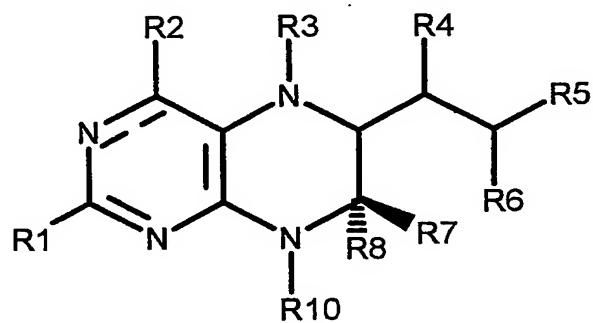
5 Somit eignen sich die erfindungsgemäßen Chaperone zur Therapie von  
Zuständen

mit erhöhtem Phenylalanin oder verminderter Tyrosin, Serotonin oder  
Dopamin in Körperflüssigkeiten, Geweben oder Zellen, insbesondere bei

10 Zuständen mit verringelter Phenylalaninhydroxylase-, Tyrosinhydroxylase-  
Tryptophanhydroxylase- und NO-Synthaseaktivität verwendet wird.

Dieser Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung  
15 wenigstens einer Verbindung gemäß folgender allgemeiner Formel als  
Neurotransmitter-oder Botenstoff-Enhancer, insbesondere für  
Catecholamine und/oder Serotonin und/oder Dopamin und/oder Stickoxid  
(NO):

20



worin R1 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH,  
F, Cl, Br, I, NH<sub>2</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub>; NH-Acyl, wobei der Acylrest 1

bis 32 Kohlenstoffatome enthält, insbesondere  $\text{CH}_3\text{O}$ , bevorzugt 9 bis 32, vorzugsweise 9 bis 20 Kohlenstoffatome, enthält;

worin R2 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH,  $\text{NH}_2$ , F, Cl, Br, I, O, S;

5       worin R3 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ;

worin R4 und R6 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH,  $\text{NH}_2$ , F, Cl, Br, I, Acetyl,  $\text{OX}$ , wobei X ein C1 bis C32 Acylrest, insbesondere ein C9 bis C32 Acylrest, bevorzugt ein

10      C9 bis C20 Acylrest, ist;

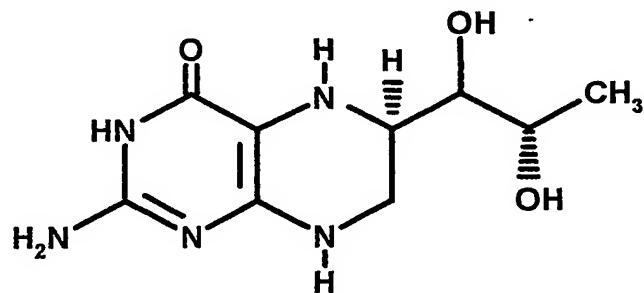
worin R5 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: Phenyl,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ , Butyl, Isobutyl, t-Butyl;

worin R7 und R8 unabhängig voneinander ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH,  $\text{NH}_2$ , F, Cl, Br, I,  $\text{CH}_3$ , COOH, CHO,

15      COOR9, wobei R9  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ , Butyl ist;

worin R10 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ , und - - eine optionale Doppelbindung darstellt; sowie  
deren pharmazeutisch akzeptablen Salze.

20      Auch als Neurotransmitter-oder Botenstoff-Enhancer wird bevorzugt eine Verbindung ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin, Sapropterin, insbesondere dessen Hydrochlorid, sowie einer Verbindung mit folgender Struktur:

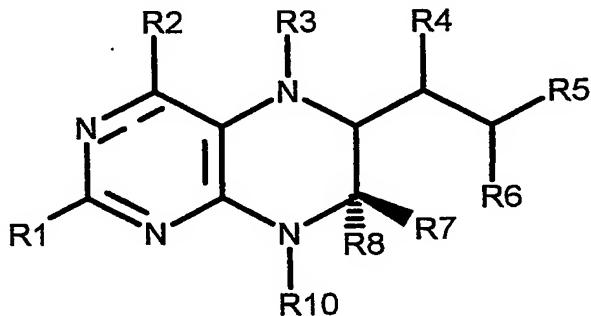


(-)-(1'R,2'S,6R)-2-Amino-6-(1',2'-dihydroxypropyl)-5,6,7,8-tetrahydro-  
4(3H)-pteridinon,

insbesondere dessen Dihydrochlorid oder Sulfat und/oder

- 5           2-N-Stearoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
           2-N-Decanoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
           2-N-Palmitoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
           2-N-Linoleoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin.

- 10          Die vorliegende Erfindung betrifft ferner eine Zusammensetzung, die  
           wenigstens eine Verbindung mit folgender allgemeiner Formel enthält:



- 15          worin R1 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH,  
           F, Cl, Br, I, NH<sub>2</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub>; NH-Acyl, wobei der Acylrest 1  
           bis 32 Kohlenstoffatome enthält, insbesondere CH<sub>3</sub>O, bevorzugt 9 bis 32,  
           vorzugsweise 9 bis 20 Kohlenstoffatome, enthält;
- 20          worin R2 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH,  
           NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, O, S;
- worin R3 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>,  
           C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>;
- worin R4 und R6 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der  
           Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, Acetyl, OX, wobei X ein

C1 bis C32 Acylrest, insbesondere ein C9 bis C32 Acylrest, bevorzugt ein C9 bis C20 Acylrest, ist;

worin R5 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: Phenyl, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl, Isobutyl, t-Butyl;

5       worin R7 und R8 unabhängig voneinander ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, CH<sub>3</sub>, COOH, CHO, COOR9, wobei R9 CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl ist;

worin R10 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, und - - eine optionale Doppelbindung darstellt; sowie

10

deren pharmazeutisch akzeptablen Salze; sowie

wenigstens eine Aminosäure enthaltend, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den essentiellen Aminosäuren: Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Threonin, Tryptophan, Valin, Histidin; sowie aus den nicht essentiellen Aminosäuren, insbesondere Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Asparagin, Cystein, insbesondere Acetylcystein, Glutaminsäure, Glutamin, Glycin, Prolin, Serin sowie Tyrosin.

20

Eine bevorzugte Zusammensetzung ist dadurch gekennzeichnet, dass sie die essentiellen Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Threonin, Tryptophan, Valin, Histidin und zusätzlich wenigstens eine der Aminosäuren Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Asparagin, Cystein, insbesondere Acetylcystein, Glutaminsäure, Glutamin, Glycin, Prolin, Serin sowie Tyrosin enthält.

Es ist ferner bevorzugt, dass die erfindungsgemäße Zusammensetzung zusätzlich Kohlehydrate, insbesondere Glucose, und/oder Vitamine enthält.

Vorzugsweise kann die erfindungsgemäße Zusammensetzung als oral oder intravenös zu verabreichendes Präparat formuliert sein.

Das Präparat kann als Pulver, Tablette, Kapsel, Dragee, in  
5 Tropfenform oder für topische Anwendungen, insbesondere Salben; sowie  
als Lösung zur intravenösen Anwendung, formuliert sein.

Selbstverständlich können derartige Zubereitungen als pharmazeutische Zusammensetzung, gegebenenfalls mit pharmazeutisch-  
10 galenisch üblichen Hilfsstoffen, ausgebildet sein.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann jedoch ebenfalls als diätetische Zusammensetzung, gegebenenfalls mit lebensmitteltechnisch üblichen Hilfsstoffen, insbesondere Emulgatoren, bevorzugt Lecitin oder  
15 Cholin, ausgebildet sein.

Darüber hinaus ist es bevorzugt, dass die erfindungsgemäße Zusammensetzung noch zusätzlich Mineralstoffe und/oder Elektrolyte enthält, welche ausgewählt sind aus: Mineralsalzen; Salinensalzen;  
20 Meersalzen; Spurenelementen, insbesondere Selen, Mangan, Kupfer, Zink, Molybdän, Jod, Chrom; Alkaliiionen, insbesondere Lithium, Natrium, Kalium; Erdalkaliiionen, insbesondere Magnesium, Calcium; Eisen.

Im Rahmen eines diätetischen Nahrungsmittels für Patienten mit  
25 Hyperphenylalaninämie kann die erfindungsgemäße Zusammensetzung sogar zusätzlich Phenylalanin enthalten, ohne dass die Gefahr einer toxischen Akkumulation von Phenylalanin im Serum, Cerebrospinalflüssigkeit und/oder dem Gehirn auftritt.

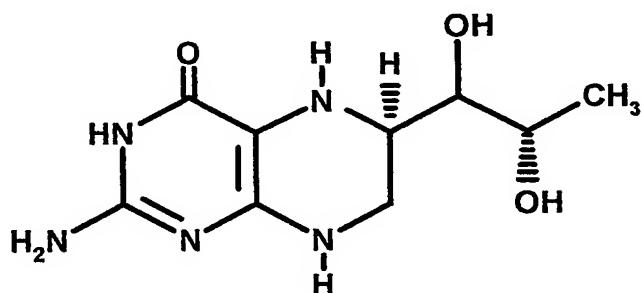
Es ist ferner bevorzugt, dass die Zusammensetzung zusätzlich noch L-Carnitin und/oder Myoinositol und/oder Cholin enthält.

Darüberhinaus kann es nützlich sein, dass die erfindungsgemäße Zusammensetzung noch die in der Lebensmitteltechnik üblichen Antioxidantien, insbesondere Vitamin C, enthält, wodurch die oxidative Zersetzung der Tetrahydrobiopterinderivate wenigstens weitgehend vermieden werden können und die Lagerstabilität der Zusammensetzung verbessert wird.

10

Bevorzugt wird eine Zusammensetzung mit einer Verbindung verwendet, wobei die Verbindung ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin, Sapropterin, insbesondere dessen Hydrochlorid, sowie einer Verbindung mit folgender Struktur:

15



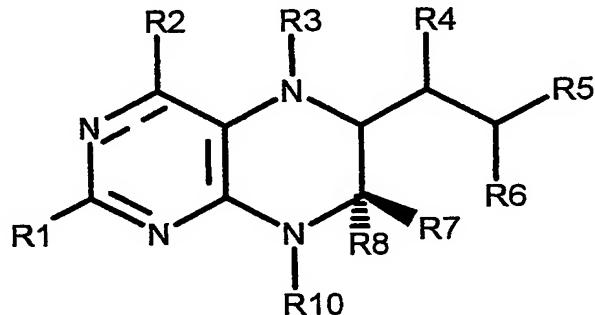
(-)-(1'R,2'S,6R)-2-Amino-6-(1',2'-dihydroxypropyl)-5,6,7,8-tetrahydro-  
20 4(3H)-pteridinone,

insbesondere dessen Dihydrochlorid oder Sulfat und/oder  
2-N-Stearoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
2-N-Decanoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
2-N-Palmitoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
25 2-N-Linoleoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin.

Der vorliegenden Erfindung kommt eine besondere Bedeutung bei der Herstellung von Nahrungsergänzungsmitteln zu, welche sich eignen, um von Aminosäurestoffwechselstörungen betroffenen Patienten eine weitgehend normale Ernährung trotz ihrer Erkrankung zu ermöglichen.

5

Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung eine Verwendung wenigstens einer Verbindung mit folgender allgemeiner Formel:



10

worin R1 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, F, Cl, Br, I, NH<sub>2</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub>; NH-Acyl, wobei der Acylrest 1 bis 32 Kohlenstoffatome enthält, insbesondere CH<sub>3</sub>O, bevorzugt 9 bis 32, vorzugsweise 9 bis 20 Kohlenstoffatome, enthält;

15 worin R2 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, O, S;

worin R3 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>;

20 worin R4 und R6 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, Acetyl, OX, wobei X ein C1 bis C32 Acylrest, insbesondere ein C9 bis C32 Acylrest, bevorzugt ein C9 bis C20 Acylrest, ist;

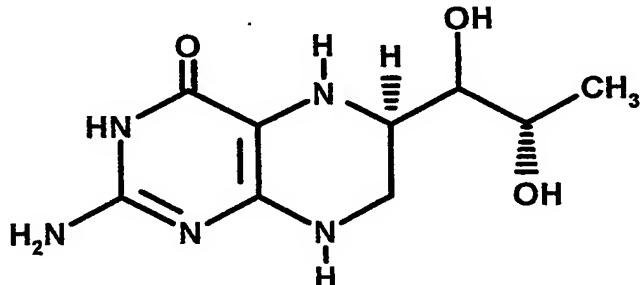
25 worin R5 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: Phenyl, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl, Isobutyl, t-Butyl;

worin R7 und R8 unabhängig voneinander ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, CH<sub>3</sub>, COOH, CHO, COOR<sub>9</sub>, wobei R9 CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl ist;

5       worin R10 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, und - - eine optionale Doppelbindung darstellt; sowie deren geeignete Salze;

als Nahrungsergänzungsmittel.

Als Nahrungsergänzungsmittel für die angesprochene Patientengruppe  
10      eignet sich insbesondere eine solche Verbindung besonders, die ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin, Sapropterin, insbesondere dessen Hydrochlorid, sowie einer Verbindung mit folgender Struktur:



15

(-)-(1'R,2'S,6R)-2-Amino-6-(1',2'-dihydroxypropyl)-5,6,7,8-tetrahydro-4(3H)-pteridinone,

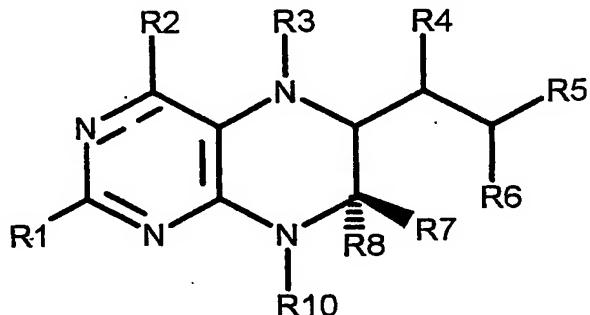
20      insbesondere dessen Dihydrochlorid oder Sulfat und/oder 2-N-Stearoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder 2-N-Decanoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder 2-N-Palmitoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder 2-N-Linoleoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin.

25

Eine herausragende Bedeutung kommt der vorliegenden Erfindung bei der Herstellung einer Spezialnahrung auf Basis von im Wesentlichen phenylalaninfreien Aminosäurenmischungen zu, mit der insbesondere Patienten mit Hyperphenylalaninämie optimal ernährt werden können.

5

Derartige Spezialnahrung enthält wenigstens eine Verbindung mit folgender allgemeiner Formel:



10

worin R1 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, F, Cl, Br, I, NH<sub>2</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub>; NH-Acyl, wobei der Acylrest 1 bis 32 Kohlenstoffatome enthält, insbesondere CH<sub>3</sub>O, bevorzugt 9 bis 32, vorzugsweise 9 bis 20 Kohlenstoffatome, enthält;

15

worin R2 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, O, S;

worin R3 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>;

20

worin R4 und R6 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, Acetyl, OX, wobei X ein C1 bis C32 Acylrest, insbesondere ein C9 bis C32 Acylrest, bevorzugt ein C9 bis C20 Acylrest, ist;

worin R5 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: Phenyl, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl, Isobutyl, t-Butyl;

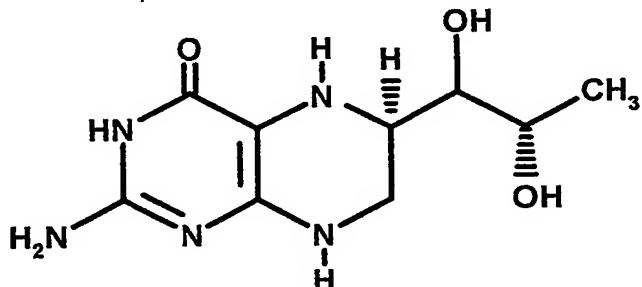
25

worin R7 und R8 unabhängig voneinander ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, CH<sub>3</sub>, COOH, CHO, COOR<sub>9</sub>, wobei R9 CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl ist;

5       worin R10 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, und -- eine optionale Doppelbindung darstellt; sowie

deren lebensmitteltechnisch akzeptablen Salze.

Als Spezialnahrung für Hyperphenylalaninämie-Patienten eignet sich  
10 besonders eine solche, welche wenigstens eine Verbindung enthält, die ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin, Sapropterin, insbesondere dessen Hydrochlorid, sowie einer Verbindung mit folgender Struktur:



15

(-)-(1'R,2'S,6R)-2-Amino-6-(1',2'-dihydroxypropyl)-5,6,7,8-tetrahydro-4(3H)-pteridinone,

20       insbesondere deren Dihydrochlorid oder Sulfat und/oder 2-N-Stearoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder 2-N-Decanoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder 2-N-Palmitoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder 2-N-Linoleoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin.

25

Zur Sicherung des vollständigen Nahrungsangebotes ist es bevorzugt, dass die erfindungsgemäße Spezialnahrung zusätzlich Kohlenhydrate, insbesondere Glucose, Maltodextrin, Stärke und/oder Fette, wie Fischöl, insbesondere Lachsöl, Heringsöl, Makrelenöl, oder Thunfischöl; enthält.

5

Es ist besonders bevorzugt, dass die Spezialnahrung hypoallergen und/oder im wesentlichen glutenfrei ist.

Da die meisten Aminosäurestoffwechselstörungen genetisch bedingte Erbkrankheiten sind, ist es erforderlich, die Patienten von Geburt an mit der richtigen Nahrung zu versorgen. Daher ist es ein besonderer Vorteil, dass die Spezialnahrung der vorliegenden Erfindung als Säuglingsnahrung, insbesondere als Milchersatzmittel sowohl für Säuglinge als auch ältere Kinder und Erwachsene, formuliert werden kann.

15

Ein derartiges Milchersatzmittel für Säuglinge weist zusätzlich einen Fettanteil auf, wobei insbesondere in etwa 90% als Triglyzeride, 10% als Mono- und Diglyzeride vorliegen.

20

Zur leichteren Konfektionierung und zur Erhöhung der Lagerstabilität wird die Spezialnahrung als Pulver, insbesondere als Lyophilisat, zur Verfügung gestellt.

25

Des Weiteren ist es bevorzugt, die erfindungsgemäße Spezialnahrung zusätzlich mit Fettsäuresupplementen zu versehen, insbesondere ungesättigte Fettsäuren, vorzugsweise Omega-3-Fettsäuren, insbesondere Alphalinolensäure, Docosahexaensäure, Eicosapentaensäure, oder Omega-6 Fettsäuren, insbesondere Arachidonsäure, Linolsäure, Linolensäure; oder Ölsäure.

30

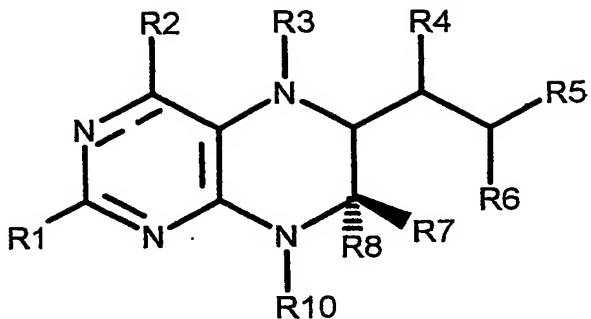
Es ist ferner bevorzugt, dass die Spezialnahrung Fischölzusätze enthält, insbesondere aus Lachs-, Hering-, Makrelen- oder Thunfischöl.

Darüber hinaus kann die Spezialnahrung einen Fettanteil aufweisen, 5 der pflanzliche Öle, insbesondere Distelöl und/oder Sojaöl und/oder Kokosöl umfasst.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Spezialnahrung der vorliegenden Erfindung ist es diese aufgrund ihres Charakters als 10 Milchersatzmittel auch als speziell für Patienten mit einer Aminosäurestoffwechselstörung, insbesondere Hyperphenylalaninämie, geeignetes Milchmixgetränk, insbesondere Fruchtmilchmixgetränk oder Kakao auszubilden.

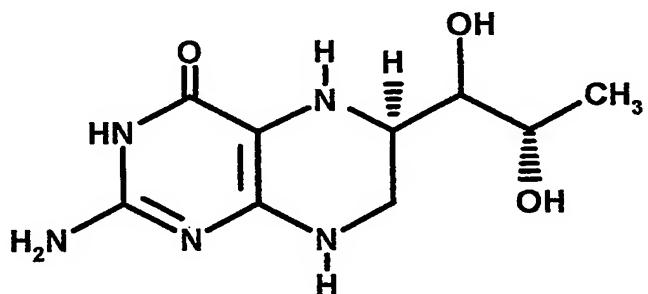
Bei der Ernährung von Patienten mit Hyperphenylalaninämie kommt 15 der vorliegenden Erfindung eine herausragende Bedeutung zu: Durch den Verdienst der Erfinder der vorliegenden Erfindung ist es erstmals möglich, solchen Patienten ein phenylalaninarmes Spezialnahrungsmittel zur Verfügung zu stellen, das durch den Zusatz von Tetrahydrobiopterin – 20 Derivaten geeignet ist die Proteintoleranz und den Abbau von Phenylalanin zu erhöhen.

Gemäß der vorliegenden Erfindung enthält ein solches phenylalaninarmes Spezialnahrungsmittel ein proteinarmes 25 Grundnahrungsmittel sowie wenigstens eine Verbindung mit folgender allgemeiner Formel:



- worin R1 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH;  
 5 F, Cl, Br, I, NH<sub>2</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub>; NH-Acyl, wobei der Acylrest 1 bis 32 Kohlenstoffatome enthält, insbesondere CH<sub>3</sub>O, bevorzugt 9 bis 32, vorzugsweise 9 bis 20 Kohlenstoffatome, enthält;
- worin R2 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, O, S;
- worin R3 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>;
- worin R4 und R6 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, Acetyl, OX, wobei X ein C1 bis C32 Acylrest, insbesondere ein C9 bis C32 Acylrest, bevorzugt ein C9 bis C20 Acylrest, ist;
- worin R5 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: Phenyl, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl, Isobutyl, t-Butyl;
- worin R7 und R8 unabhängig voneinander ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, CH<sub>3</sub>, COOH, CHO,  
 20 COOR<sub>9</sub>, wobei R9 CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl ist;
- worin R10 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, und - - eine optionale Doppelbindung darstellt; sowie  
 deren lebensmitteltechnisch akzeptablen Salze.

Für das erfindungsgemäße phenylalaninarme Spezialnahrungsmittel ist es ebenfalls bevorzugt, eine Verbindung einzusetzen, welche ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin, Sapropterin, insbesondere dessen Hydrochlorid, sowie einer Verbindung mit folgender Struktur:

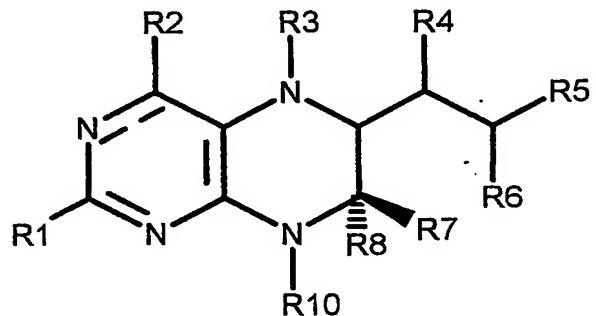


(-)-(1'R,2'S,6R)-2-Amino-6-(1',2'-dihydroxypropyl)-5,6,7,8-tetrahydro-4(3H)-pteridinon,  
 insbesondere deren Dihydrochlorid oder Sulfat und/oder  
 2-N-Stearoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
 2-N-Decanoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
 2-N-Palmitoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
 2-N-Linoleoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin.

Es ist möglich und bevorzugt, das phenylalaninarme Spezialnahrungsmittel auszubilden als: Fertiggerichte; Teigwaren, insbesondere Nudeln; Backwaren, insbesondere Brot, Kuchen, Kekse; Süßwaren, insbesondere Schokolade, Bonbons, Eis; Getränke, insbesondere Milchersatzmittel, ausgebildet als Milchmixgetränk, insbesondere als Fruchtmilchmixgetränk oder Kakao; sowie Bier.

Hiermit können Hyperphenylalaninämie-Patienten erstmals signifikant höhere Mengen an normaler Kost zu sich nehmen – ohne sich aufgrund ihrer Aminosäurestoffwechselstörung in Gefahr zu begeben – und ohne ausschließlich auf die übel schmeckenden Produkte des Stands der Technik angewiesen zu sein.

Infolge des raschen Eintritts der Wirkung von Tetrahydrobiopterinderivaten ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung schlussendlich möglich, ein Diagnostikum zur Erkennung von Tetrahydrobiopterin-sensitiven Erkrankungen des Aminosäurestoffwechsels, zur Verfügung zu stellen, welches wenigstens eine Verbindung mit folgender allgemeiner Formel enthält:



15

worin R1 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, F, Cl, Br, I, NH<sub>2</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub>; NH-Acyl, wobei der Acylrest 1 bis 32 Kohlenstoffatome enthält, insbesondere CH<sub>3</sub>O, bevorzugt 9 bis 32, vorzugsweise 9 bis 20 Kohlenstoffatome, enthält;

worin R2 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, O; S;

worin R3 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>;

worin R4 und R6 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, Acetyl, OX, wobei X ein C1 bis C32 Acylrest, insbesondere ein C9 bis C32 Acylrest, bevorzugt ein C9 bis C20 Acylrest, ist;

5       worin R5 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: Phenyl, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl, Isobutyl, t-Butyl;

      worin R7 und R8 unabhängig voneinander ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, CH<sub>3</sub>, COOH, CHO, COOR9, wobei R9 CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl ist;

10      worin R10 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, und -- eine optionale Doppelbindung darstellt;

      insbesondere 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin; sowie deren pharmazeutisch akzeptablen Salze.

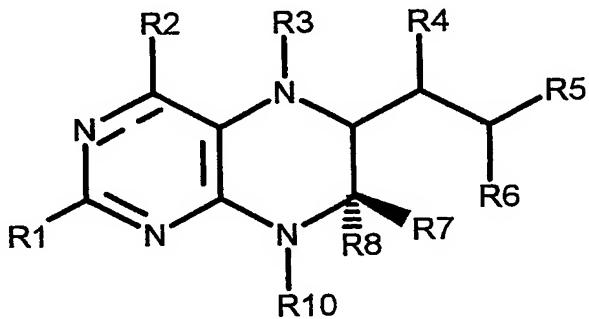
15      Zusammenfassend ist festzustellen, dass es mit den im Rahmen der vorliegenden Erfindung beschriebenen Verbindungen erstmals möglich ist, bestimmte genetisch bedingte Aminosäurestoffwechselstörungen medikamentös zu behandeln, so dass die Patienten eine Verbesserung der Proteintoleranz sowie eine weitgehende Normalisierung ihrer gestörten 20 Enzymaktivität sowie der Konzentrationen der betroffenen Aminosäuren und/oder deren Stoffwechselprodukte in Körperflüssigkeiten und Körperzellen aufweisen.

Des Weiteren schlägt die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen  
25 von Nahrungsergänzungsmitteln und Spezialnahrungen vor, die gleichzeitig die in der Erfindung beschriebenen Verbindungen zur Verbesserung der Proteintoleranz und des Abbaus von Phenylalanin enthalten. Dadurch ist es erstmals möglich ist, Patienten mit Aminosäurestoffwechselstörungen praktisch normal, d.h. mit quasi allen geschmacklichen und  
30 kompositorischen Nuancen, zu ernähren.

Neben den oben bereits mehrfach erwähnten Verbindungen können jedoch auch folgende Verbindungen als bevorzugte Ausführungsformen für sämtliche Anspruchskategorien zum Einsatz gelangen:

5 Sämtliche Einzelverbindungen sowie deren unterschiedliche Enantiomere, die sich mit den jeweils offenbarten Substituenten R1 bis R10 und X aus den dargestellten allgemeinen Formeln ergeben sowie sämtliche Unterkombinationen davon.

10 Insbesondere sollen folgende Unterkombinationen von Verbindungen Bestandteil der Offenbarung sein:



15

worin R1 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH; und/oder

20 worin R1 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: F, Cl, Br, I; und/oder

worin R1 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: NH<sub>2</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub>; und/oder

25 worin R1 NH-Acyl ist, wobei der Acylrest 1 bis 32 Kohlenstoffatome enthält, insbesondere CH<sub>3</sub>O, bevorzugt 9 bis 32, vorzugsweise 9 bis 20 Kohlenstoffatome, enthält; und/oder

worin R2 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH; und/oder

5 . . . . . worin R2 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, O, S; und/oder

worin R3 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; und/oder

10 . . . . . worin R4 und R6 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>; und/oder

15 . . . . . worin R4 und R6 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus: F, Cl, Br, I; und/oder

worin R4 und R6 unabhängig voneinander Acetyl ist; und/oder

20 . . . . . worin R4 und R6 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus: OX, wobei X ein C1 bis C32 Acylrest, insbesondere ein C9 bis C32 Acylrest, bevorzugt ein C9 bis C20 Acylrest, ist; und/oder

worin R5 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl, Isobutyl, t-Butyl; und/oder

25 . . . . . worin R5 Phenyl ist; und/oder

worin R7 und R8 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, CH<sub>3</sub>, COOH, CHO; und/oder

worin R7 und R8 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus: COOR9, wobei R9 CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl ist; und/oder

5       worin R10 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, und - - eine optionale Doppelbindung darstellt.

Es hat sich ferner herausgestellt, dass sich lipophile Tetrahydrobiopterinderivate, wie sie beispielsweise in der EP 0 164 964 A1 beschrieben sind, besonders eignen, um einerseits die Serumhalbwertszeit im Vergleich zu Tetrahydrobiopterin von ca. 8 Stunden auf über 18 Stunden zu erhöhen. Andererseits sind derartige lipophile Tetrahydrobiopterinderivate besonders geeignet, um Spezialnahrungen und Nahrungsmittelergänzungen herzustellen, da sie sich auch in fetthaltigen Gemischen, beispielsweise in Milchersatzmitteln, gut lösen.

Desweiteren liegt ein Vorteil der lipophilen Verbindungen in ihrer verminderten Oxidationsempfindlichkeit.

20       Derartige lipophile Verbindungen sind insbesondere solche, bei welchen

R1 in obiger allgemeiner Formel ein NH-Acyl ist, wobei der Acylrest insbesondere 9 bis 32, vorzugsweise 9 bis 20 Kohlenstoffatome, enthält; und/oder

R4 und R6 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus: OX, wobei X insbesondere ein C9 bis C32 Acylrest, bevorzugt ein C9 bis C20 Acylrest, ist; wobei die Substituenten R2, R3, R5,

R7, R8, R9, R10 wie im Rahmen der vorliegenden Erfindung offenbart ausgewählt sein können.

Vorzugsweise können folgende lipophile Tetrahydrobiopterinderivate  
5 für die Zwecke der vorliegenden Erfindung beispielhaft eingesetzt werden:

- 10 2-N-Stearoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
2-N-Decanoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
2-N-Palmitoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
2-N-Linoleoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin.

Tetrahydrobiopterin ist derzeit kommerziell erhältlich, so beispielsweise als Sapropterinhydrochlorid welches unter dem Namen BIOPTEN® von der Firma Suntory erhältlich ist und welches zur Therapie von genetisch bedingten Tetrahydrobiopterin-Synthesestörungen eingesetzt wird.  
15

Darüber hinaus kann Tetrahydrobiopterin und seine Derivate synthetisch hergestellt werden. Beispielhaft ist hierzu die EP 0 164 964 A1 genannt, welche u.a. die Herstellung einer Reihe von acylierten Tetrahydrobiopterinderivaten beschreibt. Des Weiteren offenbart die US 4,665,182 die organisch chemische Synthese von Biopterinderivaten.  
20

Somit bereitet die Herstellung der verwendeten Verbindungen dem Fachmann keine Schwierigkeiten.  
25

Weitere Vorteile und Merkmale ergeben sich aufgrund der Beschreibung von Ausführungsbeispielen sowie anhand der Zeichnung.

Es zeigt:

30 Fig. 1 die Phenylalaninkonzentrationen im Blut vor Provokation mit Phenylalanin sowie vor und nach Gabe von Tetrahydrobiopterin bei der milden Hyperphenylalaninämie, der milden Phenylketonurie, der milden,

nicht auf Tetrahydrobiopterin ansprechenden Phenylketonurie sowie der klassischen Phenylketonurie;

Fig. 2 die Wirkungen von Kurzzeitbehandlungen mit  
5 Tetrahydrobiopterin auf die Phenylalaninoxidation;

Fig. 3 eine Relation zwischen der kumulativen Wiederfindungsrate von  
10  $^{13}\text{C}$ -markiertem  $\text{CO}_2$  während nach Gabe von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Phenylalanin und den Phenylalanin-Blutkonzentrationen vor und nach Verabreichung von  
10 Tetrahydrobiopterin;

Fig. 4 die Wirkung von Tetrahydrobiopterin auf die periphere  
15 Phenylalanin-Clearance und Oxidationsraten bei Patienten mit  
Hyperphenylalaninämie; und

Fig. 5 die strukturelle Lokalisation von Phenylalaninhydroxylase  
Missense-Mutationen.

Tabelle 1 die Korrelation der Genotypen zu klinischen Phänotypen.

20

### Beispiele

#### *Verfahrensweise*

Um die therapeutische Wirksamkeit von Tetrahydrobiopterin zu  
25 untersuchen, führten wir einen kombinierten Phenylalanin-  
Tetrahydrobiopterin Belastungstest zur Diagnostik durch und analysierten  
die Wirkung *in vivo* mittels Bestimmung der [ $^{13}\text{C}$ ]Phenylalanin-Oxidations-  
Raten bei 38 Personen mit einem Mangel an Phenylalanin-Hydroxylase vor  
und nach Gabe von Tetrahydrobiopterinderivaten Das Ansprechen auf  
30 Tetrahydrobiopterin stand mit bestimmten Genotypen im Zusammenhang  
und wir lokalisierten Mutationen anhand des Strukturmodells des  
Phenylalanin-Hydroxylase-Monomers und daraus abzuleitende  
Proteinfehlfaltung.

### Ergebnisse

Bei 27 der 31 Patienten (87 Prozent) mit einer milden Hyperphenylalaninämie (n=10) oder einer milden Phenylketonurie (n=21) senkte Tetrahydrobiopterin deutlich den Phenylalaningehalt im Blut und erhöhte/verbesserte die Phenylalanin-Oxidation. Umgekehrt erfüllte keiner der sieben Patienten mit klassischer Phenylketonurie (n=7) das Kriterium des starken Ansprechens auf Tetrahydrobiopterin, wie es in der Studie definiert wurde. Bei einzelnen Patienten mit klassischer Phenylketonurie waren jedoch geringe Effekte nachweisbar. Eine Langzeittherapie mit Tetrahydrobiopterin, die bei fünf Kindern durchgeführt wurde, erhöhte die tägliche Phenylalanintoleranz signifikant von  $8,7 \pm 8,6$  mg/kg Körpergewicht (Spanne 8,8-30) auf  $61,4 \pm 27,9$  mg/kg Körpergewicht (Spanne 17,9-90) unter medikamentöser Behandlung ( $P=0,0043$ ) und ermöglichte ihnen damit, ihre Spezialdiät abzubrechen. Sieben Mutationen des Phenylalaninhydroxylasegens (P314S, Y417H, V177M, V245A, A300S, E290G und IVS4-5C→G) und daraus resultierende Strukturanomalie und Fehlfaltung des Enzyms wurden als höchstwahrscheinlich ursächlich in Zusammenhang stehend mit dem Ansprechen auf Tetrahydrobiopterin klassifiziert und sechs Mutationen (A403V, F39L, D415N, S310Y, R158Q und I65T) wurden als möglicherweise in Zusammenhang stehend klassifiziert. Vier Mutationen (Y414C, L48S, R261Q und 165V) standen uneinheitlich mit diesem Phänotyp in Zusammenhang. Mit dem Ansprechen auf Tetrahydrobiopterin verbundene Mutationen waren vor allem im katalytischen Bereich des Proteins lokalisiert und waren nicht direkt an der Cofaktorbindung beteiligt.

### Schlußfolgerungen:

Ein Ansprechen auf Tetrahydrobiopterinderivate - charakterisiert durch Verbesserung der Proteintoleranz, weitgehender Normalisierung gestörter Phenylalaninhydrolyseaktivität sowie Absenkung erhöhter

Phenylalaninkonzentration - tritt häufig bei Patienten mit einem milden Phänotyp einer Hyperphenylalaninämie auf. Das Ansprechen kann nicht zuverlässig anhand des Genotyps vorhergesagt werden, was vor allem bei zusammengesetzten doppelt heterozygoten Genotypen zutrifft. Die  
5 medikamentöse Behandlung mit Tetrahydrobiopterinderivaten und/oder Zusatz der Verbindungen zu Nahrungsmitteln könnte viele Patienten von ihrer sehr belastenden phenylalaninarmen Diät befreien und dadurch ihre Ernährung erleichtern.

10 Nach Einreichung der vorliegenden Patentanmeldung werden die Daten der Erfindung in wissenschaftlich begutachteter Form publiziert und dokumentiert: New England Journal of Medicine, 2002, 347 (26), 2122-2132 (26.12.02).

15

### Einleitung

Hyperphenylalaninämie, eine weitverbreitete vererbbarer Stoffwechselkrankheit, war eine der ersten genetischen Störungen, die behandelt werden konnten. In den meisten Fällen resultiert  
20 Hyperphenylalaninämie aus einem Mangel an Phenylalanin-Hydroxylase (EC1.14.16.1), hervorgerufen durch Mutationen auf dem Phenylalanin-Hydroxylase-Gen. Die damit verbundenen Phänotypen reichen in ihrem Schweregrad von der klassischen Phenylketonurie (MIM261600) bis hin zur milden Phenylketonurie und milden Hyperphenylalaninämie. Mindestens die  
25 Hälfte der betroffenen Patienten leidet an einer der milderden klinischen Phänotypen. Sowohl Patienten, die an einer klassischen Phenylketonurie leiden, als auch Patienten, die an einer milden Phenylketonurie leiden, müssen ihr Leben lang auf eine proteinarme Ernährung achten, um neurologischen Folgeerscheinungen vorzubeugen und eine normale  
30 kognitive Entwicklung sicherzustellen. Im Zusammenhang mit der sehr

strengen Spezialdiät steht das Risiko ernährungsbedingter Mangelerscheinungen, zudem stellt sie eine Belastung für die Patienten und deren Familien dar. Nur Patienten die an einer milden Hyperphenylalaninämie leiden, benötigen unter Umständen keine Behandlung. Die Suche nach 5 alternativen Behandlungsmethoden ohne Ernährungsumstellung wurde angeregt.

Bei ca. 50 genetisch bedingten Krankheiten beim Menschen kann die Behandlung durch eine hohe Dosis eines Cofaktors die Enzytmäßigkeit anregen. Tetrahydrobiopterin ist ein natürlicher Kofaktor von aromatischen 10 Aminosäurehydroxylasen und der Stickoxidsynthase. Die Substitution dieser Cofactor-Komponente ist eine etablierte Behandlungsmethode bei seltenen Fällen von Hyperphenylalaninanämie, die von angeborenen Fehlern bei der Tetrahydrobiopterin-Biosynthese herrührt. Mehr als 98 Prozent der Patienten mit Hyperphenylalaninämie weisen jedoch Mutationen auf dem 15 Phenylalanin-Hydroxylase-Gen auf und sie haben eher eine erhöhte als eine verringerte Plasmakonzentration an Biopterin, was auf die Aktivität des Guanosintriphosphatcyclohydroxylase I-Rückkopplungsregulationsproteins zurückzuführen ist. Eine mögliche therapeutische Wirkung des Tetrahydrobiopterins bei Patienten mit einem Mangel an Phenylalanin- 20 Hydroxylase wurde aus diesem Grund bisher nicht bedacht.

In jüngster Zeit wurde nachgewiesen, daß einzelne Patienten mit Mutationen auf dem Phenylalanin-Hydroxylase-Gen niedrigere Phenylalanin-Konzentrationen im Blut aufwiesen, nachdem ihnen zu diagnostischen 25 Zwecken Tetrahydrobiopterin verabreicht worden war. Es ist jedoch bekannt, daß periphere Phenylalaninwerte von verschiedenen genetischen Orten und verändernden Faktoren reguliert werden und es gibt keine Beweise, daß die positive Wirkung von Tetrahydrobiopterin auf der Ebene der Phenylalanin-Hydroxylierung erfolgt.

In dieser Studie, die mit nach dem Zufallsprinzip ausgewählten Patienten durchgeführt wurde, wurden die folgenden Fragen behandelt: (1) Wie weit ist das Ansprechen auf Tetrahydrobiopterin verbreitet? (2) Stellt Tetrahydrobiopterin die Phenylalaninoxidationsfähigkeit wieder her? (3) 5 Hängt das Ansprechen auf Tetrahydrobiopterin mit bestimmten Genotypen zusammen und befinden sich damit im Zusammenhang stehende Mutationen an bestimmten Orten der Proteinstruktur? (4) Verbessert es die Proteintoleranz bei Langzeitbehandlung?

10

## Verfahren

### Patienten

Wir erhielten eine schriftliche Zustimmungserklärung der Familien von 38 Kindern, die an verschiedenen Unterformen der Hyperphenylalaninämie 15 leiden. Die Klassifikation erfolgte in Abhängigkeit der Plasmaphenylalanin-Konzentration vor der Behandlung: <600 $\mu$ mol/l, milde Hyperphenylalaninämie, n=10, Alter 15 Tage bis 10 Jahre; 600–1200  $\mu$ mol/l, milde Phenylketonurie, n=21, Alter 8 Tage bis 17 Jahre; >1200 $\mu$ mol/l, klassische Phenylketonurie, n=7, Alter 1 Tag bis 9 Jahre. Ein Defekt bei der 20 Tetrahydrobiopterin-Biosynthese oder beim Recycling von Tetrahydrobiopterin wurde durch eine Analyse der Pterinwerte im Urin und der Dihydropteridin-Reduktaseaktivität in Erythrozyten ausgeschlossen. Wir untersuchten 7 Patienten während der Neugeborenenperiode und 31, als sie schon älter waren. Erkrankte Geschwister (n=5) wurden ebenfalls mit in die 25 Untersuchung aufgenommen, denn es ist bekannt, daß nicht-genetische Faktoren die Phenylalaninhomeostase beeinflussen.

Kombinierter Phenylalanin und Tetrahydrobiopterin  
Belastungstest

Die Aufnahme von Phenylalanin wurde erreicht, indem man die Patienten eine Mahlzeit mit 100 mg Phenylalanin pro Kilogramm Körpergewicht zu sich nehmen ließ. Eine Stunde nach dem Ende der Mahlzeit nahmen die Patienten 20 mg Tetrahydrobiopterin pro Kilogramm auf (Schircks Laboratories, Jona, Schweiz). Die Phenylalanin-Konzentration im Blut wurde durch eine Elektrospray Ionisations-Tandemmassenspektroskopie bestimmt - vor der Aufnahme von Phenylalanin und vor und nach (bei 4, 8 und 15 Stunden) Provokation mit Tetrahydrobiopterin. Während der Testphase wurden die Neugeborenen mit Muttermilch ernährt, während die älteren Kinder eine standardisierte Proteinzufuhr (10 mg Phenylalanin pro Kilogramm) zwischen sechs und acht Stunden nach der Belastung mit Tetrahydrobiopterin erhielten.

#### In vivo Analyse der L-Phenylalaninoxidation

Die Tests wurden nach vierstündigem Fasten bei Kleinkindern und einem Fasten über Nacht bei älteren Kindern durchgeführt. Insgesamt wurden 6 mg L-[1-<sup>13</sup>C]Phenylalanin (Eurostop, Paris, Frankreich) pro Kilogramm Körpergewicht oral verabreicht. Der Tracer wurde in einer 25%igen Dextroselösung aufgelöst (2 mg pro Milliliter). Anschließend wurden Atemproben über einen Zeitraum von 180 Minuten genommen und in luftleeren Gläsern bis zur Analyse mittels Isotopenmassenspektroskopie aufbewahrt (deltaS, Thermoquest, Bremen). Die Wiedergewinnung von Kohlenstoff-13 in den Atemproben wurde errechnet, wie durch Treacy et al. beschrieben, wobei eine Gesamtkohlendioxidproduktion von 300 mmol pro Stunde x Quadratmeter der Körperoberfläche angenommen wurde. Die <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>-Produktion wurde als ein kumulativer Prozentsatz der verabreichten Dosis gegen die Zeit dargestellt. Die Gültigkeit der Ergebnisse bei den Neugeborenen könnte durch die Ernährung oder die Tatsache beeinflußt werden, daß die Atemprobennahme bei ihnen schwieriger ist, als bei älteren Kindern. Der

Basislinienprozentsatz von  $^{13}\text{C}$ , gemessen zum Zeitpunkt 0 unterschied sich jedoch bei den Neugeborenen und den älteren Kindern nicht signifikant. Die Werte wurden als unterhalb der Detektierbarkeit erachtet, wenn die Signalintensität des Atom%-Überschusses zum Zeitpunkt t, erhalten durch 5 Subtraktion des durchschnittlichen Basiswertes, keine ausreichende Unterscheidung vom atmosphärischen  $^{13}\text{CO}_2$  zuließ. Im Durchschnitt waren weniger als 1 (ältere Kinder) und weniger als 2 (Neugeborene) von 27 aufeinanderfolgenden  $^{13}\text{CO}_2$ -Messungen, die während der 180 Minuten eines Einzeltests erhalten wurden, nicht interpretierbar. Dies hat einen 10 vernachlässigbaren Einfluß auf die Endauswertung.

#### Analyse der Mutationen

DNA wurde aus den Leukozyten nach dem Standardverfahren extrahiert. 13 Genomfragmente, die die gesamte kodierende Sequenz 15 beinhalten, sowie die exonflankierende, intronische Sequenz des Phenylalaninhydroxylase-Gens wurden durch eine Polymerasekettenreaktion amplifiziert, gefolgt von einer direkten Sequenzierung.

20 Strukturbasierende Lokalisation von Phenylalanin-Hydroxylase-Genmutationen  
Ein Gesamtlängenmodell der Tetrahydrobiopteringebundenen Phenylalanin-Hydroxylase wurde von den Kristallstrukturen verschiedener trunkierter Formen erstellt, indem die katalytischen Bereiche mittels der von SWISS-25 MODEL/Swiss-Pdb Viewer zur Verfügung gestellten Tools übereinander gelegt wurden.

## Ergebnisse

### Auswirkungen von Tetrahydrobiopterin auf die Phenylalanin-Konzentration im Blut und die Phenylalaninoxidationsraten

Die Patienten wurden als ansprechend auf Tetrahydrobiopterin klassifiziert, wenn die Phenylalanin-Konzentration im Blut 15 Stunden nach der Belastung mit Tetrahydrobiopterin um mindestens 30% im Vergleich zum Wert vor der Einnahme von Tetrahydrobiopterin gesunken war. Ein

Ansprechen auf Tetrahydrobiopterin wurde bei allen 10 Patienten mit einer milden Phenylalaninämie und bei 17 der 21 Patienten mit einer milden Phenylketonurie beobachtet. Nur 4 Patienten mit einer milden Phenylketonurie und alle 7 Patienten mit einer klassischen Phenylketonurie erfüllten das Kriterium des Ansprechens auf Tetrahydrobiopterin nicht (Fig. 1). Bei einigen Patienten sank die Phenylalaninkonzentration rasch ab, ähnlich wie man es bei Patienten mit einem Tetrahydrobiopterin-Synthesedefekt beobachten kann, während andere nur langsam reagierten und die niedrigste Phenylalaninkonzentration erst 15 Stunden nach der Cofaktorverabreichung erreichten (Daten nicht gezeigt).

Patienten mit unterschiedlichem klinischem Schweregrad der Erkrankung erreichten basale kumulative  $^{13}\text{CO}_2$  Wiederfindungsraten, die jeweils ihre individuelle Rest-Phenylalanin-Oxidationskapazität (klassische Phenylketonurie, Mittelwert 1,4%; milde Phenylketonurie, 3,1%; milde Hyperphenylalaninämie, 5,6%; gesunde Vergleichsgruppe 9,0%) widerspiegeln. Nach der Behandlung mit Tetrahydrobiopterin (10 mg/kg Körpergewicht, 24 Stunden) stieg die Gesamt  $^{13}\text{CO}_2$  Wiederfindung deutlich bei denselben Patienten an, die auf den Belastungstest angesprochen hatten. Der Anstieg war bei Patienten mit einer milden Phenylketonurie deutlicher ausgeprägt als bei Patienten mit einer milden

Hyperphenylalaninanämie (Fig. 2A). Es ist bemerkenswert, daß 8 von 11 Patienten, die nicht ansprachen, einen milden Anstieg der Phenylalaninoxidation nach Kurzzeittherapie mit Tetrahydrobiopterin aufwiesen, wobei bei 3 dieser Patienten gleichzeitig auch der Phenylalaningehalt im Blut beeinflußt wurde. Dies legt nahe, dass bei längerer Therapie auch bei schwereren Formen von Hyperphenylalaninanämie geringe Verbesserung durch Tetrahydrobiopterinderivate erreicht werden könnte. Die Zeitkurven der fraktionierten  $^{13}\text{CO}_2$ -Bildung zeigten deutliche Abweichungen vom normalen Oxidationsphänotyp (Fig. 2B, C, D und E).

10 Nach Cofaktorverabreichung fiel die Kurve bei Patienten, die auf Tetrahydrobiopterin ansprechen, auf den normalen Wert ab (Fig. 2B und C), wobei sie bei Patienten, die nicht auf Tetrahydrobiopterin ansprachen, unverändert blieb.

Vor der Behandlung mit Tetrahydrobiopterin wiesen alle Patienten Phenylalanin-Konzentrationen im Blut von über 200  $\mu\text{mol/l}$  auf, und die kumulative  $^{13}\text{CO}_2$  Wiederfindung lag unter 7% mit einer beachtlichen Überschneidung der Werte der Patienten, die ansprechen und der Patienten, die nicht ansprechen. Nach der Verabreichung von Tetrahydrobiopterin bildeten die beiden Patientengruppen zwei nicht überlappende Cluster. Unter den als Tetrahydrobiopterin-sensitiven Patienten fanden sich 4 Kinder, die ein moderates Ansprechen auf Tetrahydrobiopterin zeigten (Fig. 3).

Es konnte eine beachtliche interindividuelle Variabilität beobachtet werden: Die Belastung mit Tetrahydrobiopterin reduzierte die Phenylalanin-Konzentrationen um 37 bis 92%, wenn man die Blutwerte vor und 15 Stunden nach Gabe von Tetrahydrobiopterin verglich. Bei 23 der 27 auf Tetrahydrobiopterin reagierenden Patienten gingen die Phenylalanin-Konzentrationen im Blut auf Werte von unter 200  $\mu\text{mol/l}$  zurück, wobei 4 Patienten Werte zwischen 200 und 400  $\mu\text{mol/l}$  erreichten. Bei Patienten, die nicht reagieren, überstieg die Konzentration von Phenylalanin nach der

Belastung mit Tetrahydrobiopterin stets 400 µmol/l. Tetrahydrobiopterin erhöhte die <sup>13</sup>C-Phenylalaninoxidationsraten um 10 bis 91% und 22 der 27 auf Tetrahydrobiopterin reagierenden Personen erreichten Oxidationsraten auf normalem Niveau. Bei den verbleibenden 5 Patienten zeigte sich eine 5 Verbesserung, ein normales Niveau wurde jedoch nicht erreicht. Obwohl im allgemeinen konsistent, zeigten sich bei manchen Patienten bemerkenswerte Uneinheitlichkeiten des Tetrahydrobiopterineffekts auf die beiden analysierten Endpunkte. (Beispiele in Fig. 4 angegeben). Bei einem Patienten mit klassischer Phenylketonurie trat ein leichter Anstieg der 10 Phenylalanin-Konzentration im Blut auf, sowie eine Verbesserung der Phenylalaninoxidationsrate, doch der Patient erfüllte das Kriterium des starken Ansprechens auf Tetrahydrobiopterin nicht (Fig. 4).

### Langzeitbehandlung mit Tetrahydrobiopterin

15 Die Familien mit fünf Kindern im Alter von 4 bis 14 Jahren mit milder Phenylketonurie stimmten einem Therapieversuch zu, bei dem die phenylalaninarme Ernährung durch eine orale Verabreichung von Tetrahydrobiopterin in täglichen Dosen zwischen 7,1 und 10,7 mg/kg Körpergewicht ersetzt wurde. Die Behandlung dauerte  $207 \pm 51,3$  Tage 20 (Durchschnitt  $\pm$  SD; Spanne 166-263). Die Cofaktorbehandlung führte zu einem Anstieg der täglichen Phenylalanintoleranz von  $8,7 \pm 8,6$  mg/kg Körpergewicht (Spanne 8,8-30 vorher bei  $61,4 \pm 27,9$  mg/kg Körpergewicht 25 (Spanne 17,9-90) bei Behandlung ( $P=0,0043$ ) mit geringer Auswirkung auf die Phenylalanin-Konzentration im Blut (während der diätetischen Behandlung,  $366 \pm 120$  µmol/l; während der reinen Cofaktorbehandlung,  $378 \pm 173$  µmol/l).

### Identifizierung und strukturbasierende Lokalisation von Phenylalanin-Hydroxylase-Genmutationen

Bei 37 von 38 Patienten wurden jeweils zwei mutante Allele identifiziert (Tabelle 1). Wir klassifizierten 7 Mutationen (P314S, Y417H, 5 V177M, V245A, A300S, E390G, IVS4-5C>G) als *höchst wahrscheinlich* verantwortlich für das Ansprechen auf Tetrahydrobiopterin, da sie entweder in homozygoter oder funktionell hemizygoter Form nachgewiesen wurden. Sechs weitere Mutationen stehen *möglicherweise*, aufgrund einer signifikanten *in vitro* Rest-Enzymaktivität (A403V, F39L, D415N, R158Q, 10 I65T) wie bereits vorher beschrieben, oder aufgrund einer bekannten schweren Mutation auf dem zweiten Allel (S310Y) mit dem Ansprechen auf Tetrahydrobiopterin in Verbindung. Vier Mutationen (Y414C, L48S, R261Q, I65V) zeigten einen *uneinheitlichen* Zusammenhang mit dem Ansprechen auf 15 Tetrahydrobiopterin. Acht von 12 Missense-Mutationen, die im Zusammenhang mit dem Ansprechen auf Tetrahydrobiopterin stehen, befinden sich auf der katalytischen, wohingegen sich zwei auf der regulatorischen und zwei auf der Tetramerisierungs-Domäne befinden. Keine von ihnen hatte Auswirkungen auf Reste des aktiven Zentrums oder 20 auf Aminosäuren, die direkt mit dem Cofaktor interagieren (Fig. 5).

20

### Diskussion

Wir zeigen mehrere Beweisstränge auf, um deutlich zu machen, daß der metabolische Phänotyp des Mangels an Phenylalanin-Hydroxylase durch 25 pharmakologische Dosen von Tetrahydrobiopterin oder dessen Derivate signifikant modifiziert werden kann. Erstens führte die Einnahme von Tetrahydrobiopterin bei den meisten Patienten mit einer Phenylalanin-Hydroxylase-Rest-Enzymaktivität zu normalen oder annähernd normalen Phenylalanin-Konzentrationen im Blut, was nahelegt, daß das Ansprechen 30 auf Tetrahydrobiopterin bei Patienten, die phänotypisch nur leichte

Symptome aufweisen, weitverbreitet ist. Zweitens erhöhte Tetrahydrobiopterin die verbliebene Phenylalanin-Oxidationsfähigkeit bei diesen Patientengruppen. Drittens führte Langzeitbehandlung mit Tetrahydrobiopterin zu einer signifikanten Verbesserung der Proteintoleranz und Wegfall der Notwendigkeit zu einschränkender Diättherapie.

Wir zeigen, daß der *in vitro* Phenylalaninoxidations-Test eine Einteilung von Patienten mit Hyperphenylalaninämie in verschiedene Klassen unterschiedlicher Schwere ermöglicht. Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten über die Fähigkeit des Verfahrens überein, die Phenylalanin-Hydroxylase-Gen-Dosis zu messen. Aufgrund der multifaktoriellen Natur der Hyperphenylalaninämie ist die Phenylalanin-Oxidationsgeschwindigkeit im ganzen Körper nicht ein einfaches Äquivalent der Phenylalaninhydroxylase-Aktivität. Der Rückgang des Phenylalaningehalts im Blut wurde von einer Verbesserung der *in vivo* Phenylalanin-Oxidationsfähigkeit bei allen Patienten begleitet, die auf Tetrahydrobiopterin ansprechen. Alles in allem stimmen diese Beobachtungen mit der Hypothese überein, daß die Fehlfaltung des Enzyms und die gestörte Phenylalanin-Hydroxylase Aktivität durch Tetrahydrobiopterin verbessert werden kann. Das Ausmaß der Verbesserung im Phenylalaninabbau entsprach nicht immer der Verbesserung der Phenylalaninoxidation, ein nicht unerwartetes Ergebnis für einen genetisch bestimmten Enzymmangel im allgemeinen und für einen Mangel an Phenylalanin-Hydroxylase im speziellen. Wir beobachteten langsame und schnelle Reaktionen, ebenso wie Unterschiede im Zeitverlauf und im relativen Ausmaß der  $^{13}\text{CO}_2$ -Bildung, was darauf hindeutet, daß Tetrahydrobiopterin seine Wirkung durch verschiedene Wirkungsweisen und – in Abhängigkeit vom Ausmaß der Proteinfehlfaltung – mit unterschiedlicher Effizienz entfaltet. Neben dem Vorschlag, daß eine hoch dosierte Tetrahydrobiopterin-Behandlung eine verringerte Affinität der defekten Phenylalanin-Hydroxylase gegenüber Tetrahydrobiopterin kompensieren könnte, müssen zusätzliche Wirkungsweisen in Betracht gezogen werden.

Eine Behandlung mit Tetrahydrobiopterin könnte zusätzlich die Phenylalanin-Hydroxylase-Genexpression hochregulieren, Phenylalanin-Hydroxylase mRNA stabilisieren, die funktionale Phenylalanin-Hydroxylase-Tetramerbildung erleichtern oder ein falsch gefaltetes Enzymprotein vor einem proteolytischen Verdau schützen.

Vorhersagen über den Phänotyp anhand des Genotyps können bei komplexen, durch genetisch multifaktoriell bedingten Erkrankungen, wie bei Hyperphenylalaninämie, schwierig sein. In der Gruppe der Patienten, die auf Tetrahydrobiopterin ansprachen, identifizierten wir überwiegend "milde" Genotypen, wohingegen die Genotypen der Patienten, die nicht ansprachen, überwiegend "schwer" waren. Die experimentellen Hinweise auf den Zusammenhang verschiedener Mutationen mit dem Ansprechen auf Tetrahydrobiopterin sind unterschiedlich konsistent und Voraussagen anhand des Genotyps sind deshalb vor allem bei Vorliegen doppelter Heterozygotie schwierig. Es ist bekannt, daß die Y414C Mutation bei mehr als einem klinischen Phänotyp auftritt. Wir identifizierten diese Mutation in einem funktionell hemizygoten Stadium bei zwei Patienten mit identischen Genotypen aber abweichenden Reaktionen auf Tetrahydrobiopterin. Diese Beobachtung könnte dadurch erklärt werden, daß sich die Einflüsse multipler modifizierender Genorte bei Hyperphenylalaninämie unterschiedlich auswirken. Im homozygoten Zustand, der auf eine homopolymere Tetramerbildung schließen läßt, wurde festgestellt, daß die Y414C sowie die L48S Mutationen ein Ansprechen auf Tetrahydrobiopterin bedingen. Im funktionell hemizygoten Zustand entdeckten wir diese Mutationen jedoch bei Einzelpersonen mit klassischer Phenylketonurie, die nicht auf Tetrahydrobiopterin reagierten. Unter diesen Umständen könnte die Heteropolymerisation die Bildung von funktionellen Tetrameren behindern.

Unsere Daten bestätigen die Annahme, daß die meisten Missense-Mutationen im Zusammenhang mit dem Ansprechen auf Tetrahydrobiopterin

in der katalytischen Domäne des Proteins liegen, jedoch nicht in Reste des aktiven Zentrums betreffen und auch nicht direkt an der Cofaktorbindung beteiligt sind. Diese Mutationen können bei einem Monomer Auswirkungen auf die Interaktionen zwischen den Domänen haben oder Reste auf den 5 Berührungsflächen der Dimere oder Tetramere beinflussen und damit zu Fehlfaltung der Proteine und reduzierter Enzymaktivität führen. Tetrahydrobiopterin dient so als ein chemisches Chaperon und verhindert dies.

Früher wurden *in vitro* Expressionsanalysen angewendet um den 10 funktionellen Einfluß der Phenylalanin-Hydroxylase-Genmutationen *in vivo* vorherzusagen. Eine Überschätzung der Phenylalanin-Hydroxylase-Aktivitäten *in vitro* im Vergleich zu jenen *in vivo* konnte dabei beobachtet werden. Dies könnte durch die Tatsache erklärt werden, daß die *in vitro* Expressionsanalyse bisher nahezu ausschließlich in Gegenwart von hohen 15 Konzentrationen natürlicher oder synthetischer Cofaktoren ausgeführt wurde, was Genotyp-Phänotyp-Korrelation erschwerte. Überarbeitete experimentelle Protokolle, , sollten eine Reihe unterschiedlicher Tetrahydrobiopterin-Konzentrationen beinhalten, um den intrinsischen Schweregrad der Mutationen beurteilen zu können.

20 Da man aus den prätherapeutischen Plasmaphenylalankonzentrationen nicht darauf schließen kann, ob und wie auf Tetrahydrobiopterin angesprochen wird, ist eine neue klinische Klassifizierung ratsam: (1) *Hyperphenylalanämie, bei der nicht auf Tetrahydrobiopterin angesprochen wird*, (2) *Hyperphenylalanämie, bei der auf Tetrahydrobiopterin angesprochen wird*, beinhaltend (a) einen auf Tetrahydrobiopterin reagierenden Mangel an Phenylalanin-Hydroxylase und (b) Störungen im Tetrahydrobiopterin-Biosynthese-Weg. Ein Phenylalanin-Tetrahydrobiopterin Belastungstest mit einer ausgedehnten Beobachtungsphase ( $\geq 15$  Stunden) kann zuverlässig zwischen Patienten, 25 die ansprechen und Patienten, die nicht ansprechen unterscheiden und 30 die ansprechen und Patienten, die nicht ansprechen unterscheiden und

sollte bei allen Personen, die an einer Hyperphenylalaninämie leiden, durchgeführt werden um eine sichere Identifizierung der Patienten, die von einer Tetrahydrobiopterin-Behandlung profitieren könnten, sicherzustellen. Unsere auf einen kurzen Zeitraum angelegte Studie schließt die Möglichkeit 5 nicht aus, daß leichte Effekte sogar bei einigen Patienten mit klassischer Phenylketonurie erst nach einer längeren Behandlung zutage kommen.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß eine Langzeittherapie mit Tetrahydrobiopterin zu einer erhöhten Phenylalanintoleranz führt. Eine Cofaktorbehandlung, anstelle der belastenden Spezialdiät, ist für viele 10 Patienten geeignet und man kann erwarten, daß die Behandlung mit Tetrahydrobiopterinderivaten zu einer ansehnlichen Verbesserung der Lebensqualität führt. Insbesonders sollte der Zusatz dieser Verbindungen zu Nahrungsmitteln die Gestaltung der ansonsten sehr schwierigen Ernährung erheblich erleichtern. Eine Tetrahydrobiopterin-Behandlung könnte ebenfalls 15 bei einer mütterlichen Phenylketonurie hilfreich sein, da die strikte metabolische Einstellung während der Schwangerschaft sehr schwierig, aber sehr wichtig ist, um schwerwiegende negative Auswirkungen beim Neugeborenen zu vermeiden. Wie sicher oder nebenwirkungsfrei die Einnahme von Tetrahydrobiopterin während der Schwangerschaft ist, wurde 20 jedoch noch nicht festgestellt. Weltweit wurden insgesamt mehr als 350 Patienten mit einem Mangel an Tetrahydrobiopterin mit dem Cofaktor behandelt. Bei einer Beurteilung der Sicherheit wurden einige dosisabhängige unerwünschte Nebenwirkungen wie Schlafstörungen, Polyurie und dünner Stuhl beobachtet (BIOPTEN® Approbationszettel, 25 Suntory, Japan).

Einige Hindernisse müssen aus dem Weg geräumt werden, bis die Behandlung mit Tetrahydrobiopterin zu einer Routinebehandlung werden kann. Erstens ist Tetrahydrobiopterin in den meisten Ländern noch kein zugelassenes Medikament. Zweitens ist es immer noch teuer. Drittens 30 werden noch Studien über die zu verabreichenden Dosen, sowie klinische

Untersuchungen im Hinblick auf die Bioverfügbarkeit und die noch unbekannten Langzeitnebenwirkungen von Tetrahydrobiopterin bei Phenylalanin-Hydroxylase-Mangel benötigt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass wir zeigen, daß pharmakologische Dosen von Tetrahydrobiopterin bei den meisten Patienten mit Hyperphenylalaninämie eines weniger schweren Phänotyps über eine Behebung von Proteinfehlfaltung eine gestörte Phenylalaninoxidation deutlich verbessern oder ganz normalisieren können. Darüber hinaus kann eine verbesserte Proteintoleranz und eine Lockerung der diätetischen Maßnahmen erreicht werden. Diese Erkenntnisse sind für das diagnostische Vorgehen, die klinische Klassifikation und das therapeutisch Vorgehen von Bedeutung. In naher Zukunft wird die Cofaktorbehandlung viele Patienten von ihrer sehr belastenden Einschränkung der Ernährung befreien.

TABELLE 1. GENOTYPEN VON PATIENTEN MIT TETRAHYDROBIOPTERIN-SENSITIVER UND  
NICHT-SENSITIVER HYPERPHENYLALANINÄMIE

ID	ALLEL 1	ALLEL 2	PHÄNOTYP	TETRAHYDROBIOPTERIN-SENSITIVITÄT
1	<b>A403V</b>	IVS4+5G>T	Milde	Ja
2	<b>A403V</b>	n.i.	Milde	Ja
3	<u>P314S*</u>	R408W <sup>†</sup>	Milde	Ja
4	<b>F39L</b>	<b>D415N</b>	Milde	Ja
5	<b>Y414C</b>	<b>D415N</b>	Milde	Ja
6	<u>Y417H*</u>	<u>Y417H*</u>	Milde Phenvlketonurie	Ja
7	<b>F55L</b>	S310Y*	Milde	Ja
8	<b>R261Q</b>	<b>Y414C</b>	Milde Phenvlketonurie	Ja
9	<u>V177M</u>	R408W <sup>†</sup>	Milde	Ja
10	<u>P275L*</u>	<b>Y414C</b>	Milde Phenvlketonurie	Ja
11	<u>V245A</u>	R408W <sup>†</sup>	Milde	Ja
12	<b>L48S</b>	<b>R158Q</b>	Milde Phenvlketonurie	Ja
13	<u>Y417H*</u>	<u>Y417H*</u>	Milde Phenvlketonurie	Ja
14	<u>V245A</u>	R408W <sup>†</sup>	Milde	Ja
15	R261X <sup>†</sup>	<u>A300S</u>	Milde Phenvlketonurie	Ja
16	<b>R158Q</b>	<u>E390G</u>	Milde Phenvlketonurie	Ja
17	R261X <sup>†</sup>	<u>A300S</u>	Milde Phenvlketonurie	Ja
18	<u>Y414C</u>	IVS12+1G>A <sup>†</sup>	Milde Phenvlketonurie	Ja
19	I65S*	<u>A300S</u>	Milde Phenvlketonurie	Ja
20	<b>R261Q</b>	<b>Y414C</b>	Milde Phenvlketonurie	Ja
21	K274fsdel11b	<u>E390G</u>	Milde Phenvlketonurie	Ja
22	<u>IVS4-5C&gt;G</u>	R408W <sup>†</sup>	Milde Phenvlketonurie	Ja
23	R261X <sup>†</sup>	<u>A300S</u>	Milde Phenvlketonurie	Ja
24	I65T	<b>Y414C</b>	Milde Phenvlketonurie	Moderat
25	<u>E390G</u>	IVS12+1G>A <sup>†</sup>	Milde Phenvlketonurie	Moderat
26	I65V	<b>R261Q</b>	Milde	Moderat
27	<b>R158Q</b>	<b>Y414C</b>	Milde Phenvlketonurie	Moderat

Tabelle 1 - Fortsetzung

ID	ALLEL 1	ALLEL 2	PHÄNOTYP	TETRAHYDROBIOPTERIN-SENSITIVITÄT
28	<b>Y414C</b>	IVS12+1G>A <sup>†</sup>	Klassische	Nein
29	P281L <sup>†</sup>	<b>Y414C</b>	Milde Phenylketonurie	Nein
30	I65V	IVS12+1G>A <sup>†</sup>	Milde Phenylketonurie	Nein
31	<b>I65V</b>	IVS12+1G>A <sup>†</sup>	Milde Phenylketonurie	Nein
32	N61D*	R261Q	Milde Phenylketonurie	Nein
33	R408W <sup>†</sup> , R413P	<b>Y414C</b>	Klassische	Nein
34	P281L <sup>†</sup>	P281L <sup>†</sup>	Klassische	Nein
35	R243X <sup>†</sup>	<b>Y414C</b>	Klassische	Nein
36	<b>L48S</b>	P281L <sup>†</sup>	Klassische	Nein
37	R261Q	R408W <sup>†</sup>	Klassische	Nein
38	R243X <sup>†</sup>	IVS7+1G>A	Klassische	Nein

5 Mutationen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit mit Tetrahydrobiopterin-Sensitivität assoziiert sind, sind grau hinterlegt

Mutationen, die potentiell mit Tetrahydrobiopterin-Sensitivität assoziiert sind, sind fett gedruckt

Mutationen, die inkonsistent mit Tetrahydrobiopterin-Sensitivität assoziiert sind, sind kursiv

10 gedruckt

\* Bisher nicht beschriebene Mutation

† Putative Nullmutation

a.i. nicht identifiziert

## Figurenlegende

### Figur 1

5 Wirkung von Tetrahydrobiopterin auf die Phenylalaninkonzentration im Blut. Phenylalaninkonzentration im Blut (Phe) vor der Phenylalaninbelastung und vor und nach der Herausforderung durch Tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ). Die Kästchen stellen das 50%ige Vertrauensintervall dar (25. - 75. Percentile);  
10 die horizontalen schwarzen Balken stellen die Mediane dar; die Fehlerbalken zeigen die Spanne zwischen Minimum und Maximum an. Der Wert P betrifft die Differenz zwischen dem Phenylalaningehalt im Blut vor und 15 Stunden nach der Verabreichung von Tetrahydrobiopterin.

### 15 Figur 2

Wirkung der Kurzzeitbehandlung mit Tetrahydrobiopterin auf die Phenylalaninoxidation in vivo. A kumulative  $^{13}\text{CO}_2$  (180 min.)-Wiederfindung vor und nach der Behandlung mit Tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ). Die Kästchen stellen das 50%ige Vertrauensintervall dar (25. – 75. Percentile); die horizontalen schwarzen Balken stellen die Mediane dar; die Fehlerbalken zeigen die Spanne zwischen Minimum und Maximum. B-E Fraktionalanalyse der  $^{13}\text{CO}_2$ -Bildung bei repräsentativen Patienten mit einer beeinträchtigten Phenylalaninhydroxylase vor (□) und nach (λ) einer Kurzzeitbehandlung mit  
20 Tetrahydrobiopterin.  
25 Tetrahydrobiopterin.

### Figur 3

Beziehung zwischen der kumulativen  $^{13}\text{CO}_2$  Wiederfindung (180 min.) und  
30 der Phenylalaninkonzentration im Blut vor und nach der Behandlung mit

Tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ). Patienten, die auf Tetrahydrobiopterin nicht ansprechen: O; Patienten, die auf Tetrahydrobiopterin ansprechen:  $\lambda$ ; Patienten, die moderat auf Tetrahydrobiopterin ansprechen:  $\lambda$ .

5 **Figur 4**

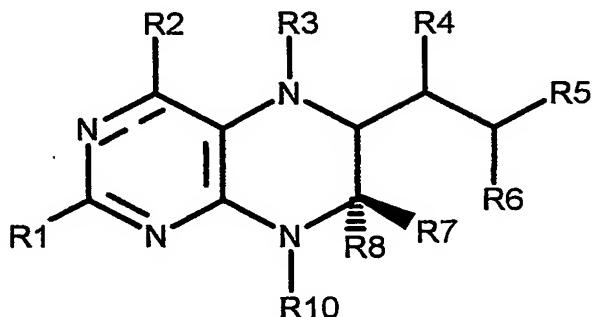
Wirkung von Tetrahydrobiopterin auf die periphere Phenylalanin-Clearance und auf die Oxidationsraten bei einzelnen Hyperphenylalaninämiepatienten. Die Phenylalaninkonzentration im Blut vor (ausgefüllter Balken) und 15 10 Stunden nach der Verabreichung von Tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ) (dunkelgrauer Balken). Die durch Tetrahydrobiopterin bei einzelnen Patienten erhaltenen, positiven Wirkungen werden durch einen schwarzen Pfeil dargestellt (oberes Feld). Kumulative  $^{13}\text{CO}_2$  Wiederfindung (180 min.) vor (hellgrauer Balken) und nach der Verabreichung von Tetrahydrobiopterin 15 15 (ausgefüllter Balken). Die durch Tetrahydrobiopterin verursachte Verbesserung bei einzelnen Patienten wird durch einen schwarzen Pfeil (unteres Feld) dargestellt. Die normale Spanne (n. r.) für die in vivo Phenylalaninoxidation, die durch eine gesunde Kontrollgruppe im Alter von 2 Tagen bis 13 Jahren festgesetzt wurde, wird angegeben ( $8.3 \pm 2.8\%$ ; Durchschnitt  $\pm$  SD, n=12). Unregelmäßigkeiten bei der Wirkung von 20 Tetrahydrobiopterin: deutlicher Rückgang der Phenylalaninkonzentration im Blut, jedoch geringe Erhöhung der Phenylalaninoxidation bei einem Patient ( $\lambda$ ) und geringe Wirkung auf die Phenylalaninkonzentration im Blut sowie 25 eine große Erhöhung der Phenylalaninoxidation bei einem anderen Patienten (H). Leichtes Ansprechen auf Tetrahydrobiopterin entspricht nicht dem Kriterium des Ansprechens auf Tetrahydrobiopterin bei einem Patienten mit klassischer Phenylketonurie (v).

**Figur 5**

Strukturelle Lokalisierung von Phenylalanin-Hydroxylase Missense-Mutationen. Das Phenylalanin-Hydroxylase-Monomer, dargestellt in Form eines Bandes, setzt sich aus drei funktionellen Domänen zusammen: die regulatorische Domäne (Reste 1-142), die katalytische Domäne (Reste 143-410), und die Tetramerisierungsdomäne (Reste 411-452). Das Eisen am aktiven Zentrum (brauner Bereich, teilweise verdeckt) und das Cofaktoranalog 7,8-Dihydro-Tetrahydrobiopterin Stabmodell (stick model) befinden sich auf der katalytischen Domäne. Mutationen, die *höchstwahrscheinlich* mit dem Ansprechen auf Tetrahydrobiopterin in Verbindung stehen, sind türkisfarben dargestellt. Mutationen, die *möglicherweise* mit dem Ansprechen auf Tetrahydrobiopterin in Verbindung stehen, sind grün dargestellt. Mutationen, die *uneinheitlich* mit dem Ansprechen auf Tetrahydrobiopterin in Verbindung stehen, sind purpurrot dargestellt.

Ansprüche

- 5        1.      Verwendung wenigstens einer Verbindung mit folgender allgemeiner Formel:



- 10        worin R1 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, F, Cl, Br, I, NH<sub>2</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub>; NH-Acyl; wobei der Acylrest 1 bis 32 Kohlenstoffatome enthält, insbesondere CH<sub>3</sub>O, bevorzugt 9 bis 32, vorzugsweise 9 bis 20 Kohlenstoffatome, enthält;
- 15        worin R2 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, O, S;
- worin R3 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>;
- 20        worin R4 und R6 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, Acetyl, OX, wobei X ein C1 bis C32 Acylrest, insbesondere ein C9 bis C32 Acylrest, bevorzugt ein C9 bis C20 Acylrest, ist;
- 25        worin R5 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: Phenyl, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl, Isobutyl, t-Butyl;

worin R7 und R8 unabhängig voneinander ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, CH<sub>3</sub>, COOH, CHO, COOR<sub>9</sub>, wobei R9 CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl ist; worin R10 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, und - - eine optionale Doppelbindung darstellt; sowie

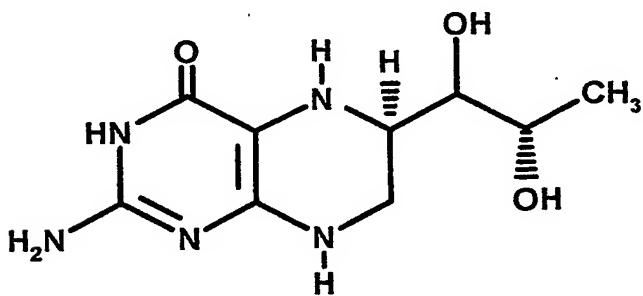
5

deren pharmazeutisch akzeptablen Salze;

zur Herstellung eines Medikamentes zur Verbesserung der  
10 Proteintoleranz zur Behandlung von Erkrankungen als Folge  
eines gestörten Aminosäurestoffwechsels.

15

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin, Sapropterin, insbesondere dessen Hydrochlorid oder Sulfat, sowie einer Verbindung mit folgender Struktur:



20

(-)-(1'R,2'S,6R)-2-Amino-6-(1',2'-dihydroxypropyl)-5,6,7,8-tetrahydro-4(3H)-pteridinon,

25

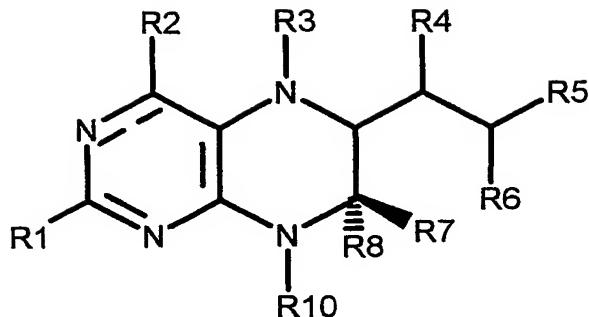
insbesondere dessen Dihydrochlorid; und/oder

2-N-Stearoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder

2-N-Decanoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
2-N-Palmitoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
2-N-Linoleoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin.

5

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als Salze Hydrochloride oder Sulfate einsetzt.
- 10 4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäurestoffwechselstörungen umfassen: Zustände mit erhöhtem Phenylalanin oder verminderter Tyrosin in Körperflüssigkeiten, Geweben oder Zellen umfaßt, insbesondere Zustände mit verringelter Phenylalaninhydroxylaseaktivität, insbesondere Zustände bedingt durch verminderte zelluläre Verfügbarkeit von Katecholaminen, insbesondere orthostatische Hypotension (Shy-Drager Syndrom), muskuläre Dystonie; sowie Neurotransmitterstörungen, insbesondere Schizophrenie; Phenylketonurie, insbesondere milde Phenylketonurie, klassische Phenylketonurie; Pigmentstörungen der Haut, insbesondere Vitiligo.
- 15 5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man als pharmazeutisch akzeptables Salz ein Hydrochlorid verwendet.
- 20 6. Verwendung von wenigstens einer Verbindung mit folgender allgemeinen Formel als Chaperon:



worin R1 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH,  
 5 SH, F, Cl, Br, I, NH<sub>2</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub>; NH-Acyl,  
 wobei der Acylrest 1 bis 32 Kohlenstoffatome enthält,  
 insbesondere CH<sub>3</sub>O, bevorzugt 9 bis 32, vorzugsweise 9 bis  
 20 Kohlenstoffatome, enthält;

worin R2 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH,  
 10 SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, O, S;

worin R3 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>,  
 C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>;

worin R4 und R6 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus  
 der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I,  
 15 Acetyl, OX, wobei X ein C1 bis C32 Acylrest, insbesondere  
 ein C9 bis C32 Acylrest, bevorzugt ein C9 bis C20 Acylrest,  
 ist;

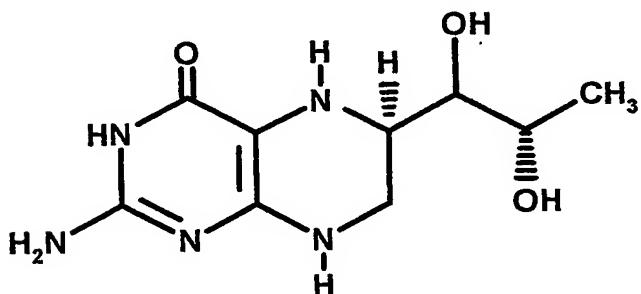
worin R5 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: Phenyl,  
 CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl, Isobutyl, t-Butyl;

worin R7 und R8 unabhängig voneinander ausgewählt wird aus der  
 Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, CH<sub>3</sub>,  
 COOH, CHO, COOR<sub>9</sub>, wobei R9 CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl ist;

worin R10 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>,  
 C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, und - - eine optionale Doppelbindung darstellt; sowie

deren pharmazeutisch akzeptablen Salze.

7. Verwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin, Sapropterin, insbesondere dessen Hydrochlorid, sowie einer Verbindung mit folgender Struktur:



10

$(-)-(1'\text{R},2'\text{S},6\text{R})$ -2-Amino-6-(1',2'-dihydroxypropyl)-5,6,7,8-tetrahydro-4(3H)-pteridinon,

insbesondere dessen Dihydrochlorid oder Sulfat und/oder  
15 2-N-Stearoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
2-N-Decanoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
2-N-Palmitoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
2-N-Linoleoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin.

20

8. Verwendung nach Anspruch 6 oder 7 zur Verbesserung von Proteinmißfaltung, insbesondere bei Strukturanomalien in Enzymen, die Tetrahydrobiopterin als Cofaktor benötigen.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzyme ausgewählt werden aus: Phenylalaninhydroxylase, Tyrosinhydroxylase, Tryptophanhydroxylase, oder NO-Synthase.

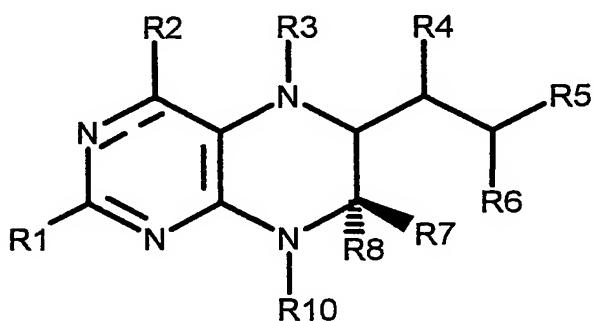
5

10. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Chaperon als Neurotransmitter- und/oder Botenstoff-Enhancer verwendet wird, insbesondere bei Zuständen mit erhöhtem Phenylalanin oder vermindertem Tyrosin, Serotonin oder Dopamin in Körperflüssigkeiten, Geweben oder Zellen, insbesondere bei Zuständen mit verringrigerter Phenylalaninhydroxylase-, Tyrosinhydroxylase-, Tryptophanhydroxylase- und NO-Synthaseaktivität verwendet wird.

10

15. Verwendung von wenigstens einer Verbindung gemäß folgender allgemeiner Formel als Neurotransmitter- oder als Botenstoff-Enhancer, insbesondere für Catecholamine und/oder Serotonin und/oder Dopamin und oder Stickoxid(NO):

20



worin R1 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, F, Cl, Br, I, NH<sub>2</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub>; NH-Acyl, wobei der Acylrest 1 bis 32 Kohlenstoffatome enthält, insbesondere CH<sub>3</sub>O, bevorzugt 9 bis 32, vorzugsweise 9 bis 20 Kohlenstoffatome, enthält;

5

worin R2 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, O, S;

worin R3 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>;

10

worin R4 und R6 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, Acetyl, OX, wobei X ein C1 bis C32 Acylrest, insbesondere ein C9 bis C32 Acylrest, bevorzugt ein C9 bis C20 Acylrest, ist;

15

worin R5 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: Phenyl, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl, Isobutyl, t-Butyl;

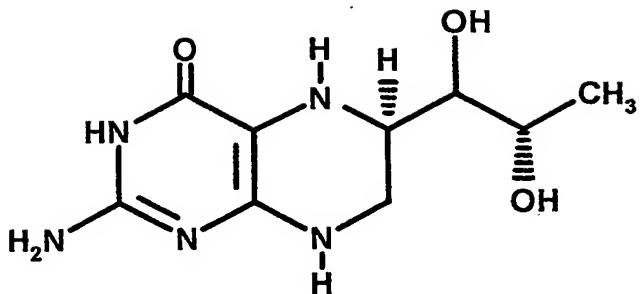
worin R7 und R8 unabhängig voneinander ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, CH<sub>3</sub>, COOH, CHO, COOR9, wobei R9 CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl ist;

20

worin R10 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, und - - eine optionale Doppelbindung darstellt; sowie deren pharmazeutisch akzeptablen Salze.

25

12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin, Sapropterin, insbesondere dessen Hydrochlorid, sowie einer Verbindung mit folgender Struktur:



(-)-(1'R,2'S,6R)-2-Amino-6-(1',2'-dihydroxypropyl)-5,6,7,8-tetrahydro-  
4(3H)-pteridinon,

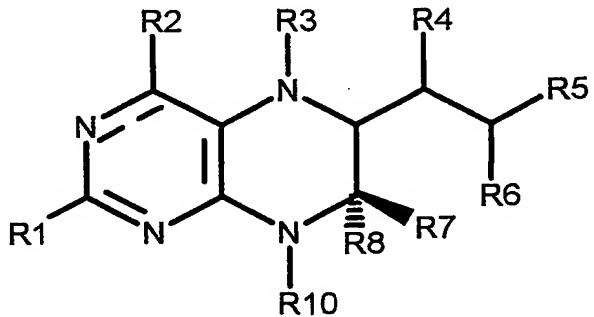
5

insbesondere dessen Dihydrochlorid oder Sulfat und/oder  
2-N-Stearoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
2-N-Decanoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
2-N-Palmitoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
2-N-Linoleoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin.

10

13. Zusammensetzung enthaltend wenigstens eine Verbindung mit folgender allgemeiner Formel:

15



worin R1 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH,  
SH, F, Cl, Br, I, NH<sub>2</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub>; NH-Acyl,  
wobei der Acylrest 1 bis 32 Kohlenstoffatome enthält,

20

insbesondere  $\text{CH}_3\text{O}$ , bevorzugt 9 bis 32, vorzugsweise 9 bis 20 Kohlenstoffatome, enthält;

worin R2 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH,  $\text{NH}_2$ , F, Cl, Br, I, O, S;

5 worin R3 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ;

worin R4 und R6 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH,  $\text{NH}_2$ , F, Cl, Br, I, Acetyl,  $\text{OX}$ , wobei X ein C1 bis C32 Acylrest, insbesondere ein C9 bis C32 Acylrest, bevorzugt ein C9 bis C20 Acylrest, ist;

worin R5 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: Phenyl,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ , Butyl, Isobutyl, t-Butyl;

15 worin R7 und R8 unabhängig voneinander ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH,  $\text{NH}_2$ , F, Cl, Br, I,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{COOH}$ , CHO, COOR9, wobei R9  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ , Butyl ist;

worin R10 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ , und - - eine optionale Doppelbindung darstellt; sowie

20 deren pharmazeutisch akzeptablen Salze; sowie

wenigstens eine Aminosäure enthaltend, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den essentiellen Aminosäuren: Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Threonin, Tryptophan, Valin, Histidin; sowie aus den nicht essentiellen Aminosäuren, insbesondere Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Asparagin, Cystein, insbesondere Acetylcystein, Glutaminsäure, Glutamin, Glycin, Prolin, Serin sowie Tyrosin.

14. Zusammensetzung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass sie die essentiellen Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Threonin, Tryptophan, Valin, Histidin und zusätzlich wenigstens eine der Aminosäuren Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Asparagin, Cystein, insbesondere Acetylcystein, Glutaminsäure, Glutamin, Glycin, Prolin, Serin sowie Tyrosin enthält.  
5
15. Zusammensetzung nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich Kohlehydrate, insbesondere Glucose, und/oder Vitamine enthält.  
10
16. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass sie als oral oder intravenös zu verabreichendes Präparat formuliert ist.  
15
17. Zusammensetzung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Präparat als Pulver, Tablette, Kapsel, Dragee in Tropfenform oder für topische Anwendungen, insbesondere Salben; sowie als Lösung zur intravenösen Anwendung, formuliert ist.  
20
18. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass sie als eine pharmazeutische Zusammensetzung, gegebenenfalls mit pharmazeutisch-galenisch üblichen Hilfsstoffen, ausgebildet ist.  
25
19. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 13 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass sie als diätetische Zusammensetzung, gegebenenfalls mit lebensmitteltechnisch  
30

üblichen Hilfsstoffen, insbesondere Emulgatoren, bevorzugt Lecitin, Cholin, ausgebildet ist.

20. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 13 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich Mineralstoffe und/oder Elektrolyte enthält, welche ausgewählt sind aus: Mineralsalzen; Salinensalzen; Meersalzen; Spurenelementen, insbesondere Selen, Mangan, Kupfer, Zink, Molybdän, Jod, Chrom; Alkaliionen, insbesondere Lithium, Natrium, Kalium; Erdalkaliionen, insbesondere Magnesium, Calcium; Eisen.

10  
21. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 13 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich Phenylalanin enthält.

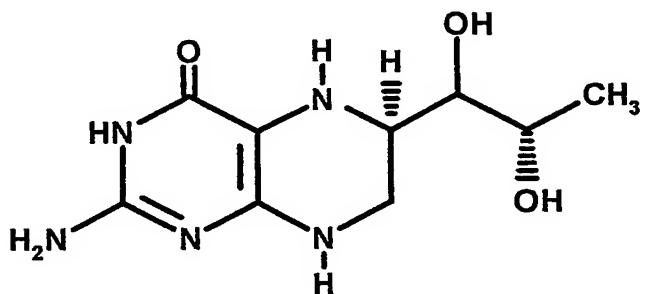
15  
22. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 13 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich L-Carnitin enthält.

20  
23. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 13 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich Myoinositol und Cholin enthält.

25  
24. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 13 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß sie Antioxidantien, insbesondere Vitamin C enthält.

25. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 13 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin,

Sapropterin, insbesondere dessen Hydrochlorid, sowie einer Verbindung mit folgender Struktur:



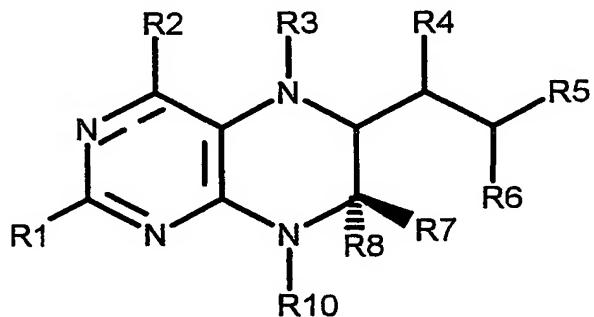
5

(-)-(1'R,2'S,6R)-2-Amino-6-(1',2'-dihydroxypropyl)-5,6,7,8-tetrahydro-4(3H)-pteridinon,

insbesondere dessen Dihydrochlorid oder Sulfat und/oder

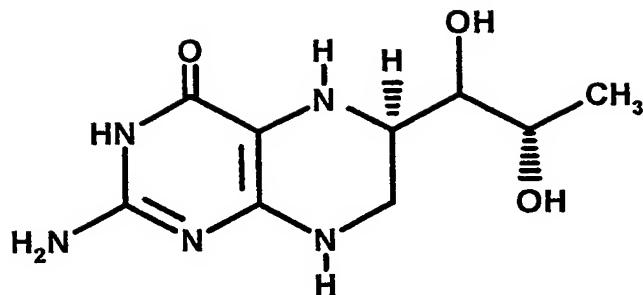
10 2-N-Stearoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
 2-N-Decanoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
 2-N-Palmitoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
 2-N-Linoleoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin.

15 26. Verwendung wenigstens einer Verbindung mit folgender allgemeiner Formel:



20

- worin R1 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH,  
SH, F, Cl, Br, I, NH<sub>2</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub>; NH-Acyl,  
wobei der Acylrest 1 bis 32 Kohlenstoffatome enthält,  
insbesondere CH<sub>3</sub>O, bevorzugt 9 bis 32, vorzugsweise 9 bis  
20 Kohlenstoffatome, enthält;
- worin R2 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH,  
SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, O, S;
- worin R3 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>,  
C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>;
- worin R4 und R6 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus  
der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I,  
Acetyl, OX, wobei X ein C1 bis C32 Acylrest, insbesondere  
ein C9 bis C32 Acylrest, bevorzugt ein C9 bis C20 Acylrest,  
ist;
- worin R5 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: Phenyl,  
CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl, Isobutyl, t-Butyl;
- worin R7 und R8 unabhängig voneinander ausgewählt wird aus der  
Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, CH<sub>3</sub>,  
COOH, CHO, COOR9, wobei R9 CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl ist;
- worin R10 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>,  
C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, und - - eine optionale Doppelbindung darstellt; sowie  
deren geeignete Salze;
- als Nahrungsergänzungsmittel.
27. Verwendung nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass  
die Verbindung ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus:  
5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin, Sapropterin, insbesondere dessen  
Hydrochlorid, sowie einer Verbindung mit folgender Struktur:



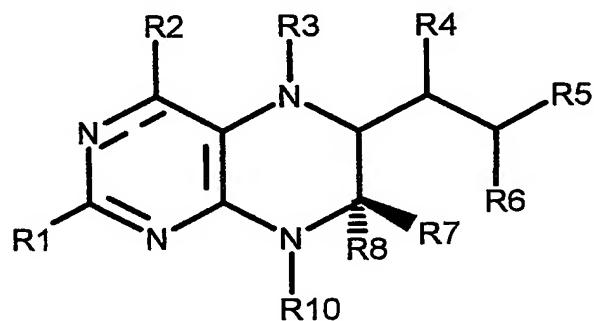
(-)-(1'R,2'S,6R)-2-Amino-6-(1',2'-dihydroxypropyl)-5,6,7,8-tetrahydro-  
4(3H)-pteridinon,

5

insbesondere dessen Dihydrochlorid oder Sulfat und/oder  
2-N-Stearoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
2-N-Decanoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
2-N-Palmitoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
2-N-Linoleoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin.

10

28. Spezialnahrung auf Basis von im wesentlichen  
phenylalaninfreien Aminosäuremischungen, dadurch  
gekennzeichnet, dass sie wenigstens eine Verbindung mit  
15 folgender allgemeiner Formel enthält:



5

worin R1 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, F, Cl, Br, I, NH<sub>2</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub>; NH-Acyl, wobei der Acylrest 1 bis 32 Kohlenstoffatome enthält, insbesondere CH<sub>3</sub>O, bevorzugt 9 bis 32, vorzugsweise 9 bis 20 Kohlenstoffatome, enthält;

10

worin R2 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, O, S;

worin R3 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>;

15

worin R4 und R6 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, Acetyl, OX, wobei X ein C1 bis C32 Acylrest, insbesondere ein C9 bis C32 Acylrest, bevorzugt ein C9 bis C20 Acylrest, ist;

20

worin R5 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: Phenyl, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl, Isobutyl, t-Butyl;

worin R7 und R8 unabhängig voneinander ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, CH<sub>3</sub>, COOH, CHO, COOR9, wobei R9 CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl ist;

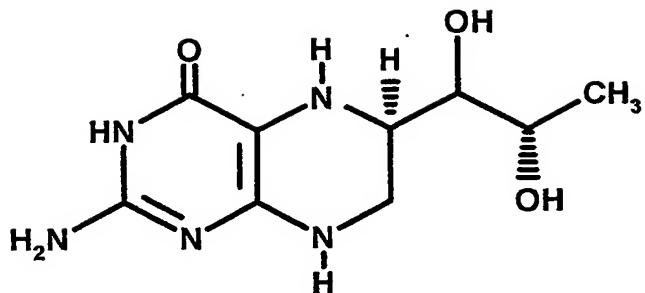
25

worin R10 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, und - - eine optionale Doppelbindung darstellt; sowie

deren lebensmitteltechnisch akzeptablen Salze.

30

29. Spezialnahrung nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass sie wenigstens eine Verbindung enthält, welche ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin, Sapropterin, insbesondere dessen Hydrochlorid, sowie einer Verbindung mit folgender Struktur:



5                   (-)-(1'R,2'S,6R)-2-Amino-6-(1',2'-dihydroxypropyl)-5,6,7,8-tetrahydro-  
4(3H)-pteridinon,

insbesondere deren Dihydrochlorid oder Sulfat und/oder  
2-N-Stearoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
2-N-Decanoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
10                 2-N-Palmitoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
2-N-Linoleoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin.

- 15                 30. Spezialnahrung nach Anspruch 28 oder 29, dadurch  
gekennzeichnet, dass sie zusätzlich Kohlehydrate,  
insbesondere Glucose, Maltodextrin, Stärke und/oder Fette,  
wie Fischöl, insbesondere Lachsöl, Heringsöl, Makrelenöl, oder  
Thunfischöl; enthalten.
- 20                 31. Spezialnahrung nach einem der Ansprüche 28 bis 30, dadurch  
gekennzeichnet, dass sie hypoallergen und/oder im  
wesentlichen glutenfrei ist.
- 25                 32. Spezialnahrung nach einem der Ansprüche 28 bis 31, dadurch  
gekennzeichnet, dass sie eine Säuglingsnahrung ist.

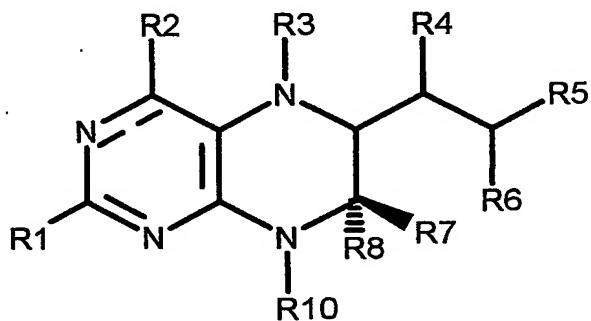
33. Spezialnahrung nach einem der Ansprüche 28 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass sie als Pulver, insbesondere als Lyophilisat, vorliegt.
- 5 34. Spezialnahrung nach einem der Ansprüche 28 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich Fettsäuresupplemente, insbesondere ungesättigte Fettsäuren, vorzugsweise Omega-3-Fettsäuren, insbesondere Alphalinolensäure, Docosahexaensäure, Eicosapentaensäure, oder Omega-6-Fettsäuren, insbesondere Arachidonsäure, Linolsäure, Linolensäure; oder Ölsäure enthält.
- 10 35. Spezialnahrung nach einem der Ansprüche 28 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß sie Fischölzusätze, insbesondere aus Lachs-, Hering-, Makrelen- oder Thunfischöl, enthält.
- 15 36. Spezialnahrung nach einem der Ansprüche 28 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Milchersatzmittel, insbesondere für Säuglinge, verwendbar ist.
- 20 37. Spezialnahrung nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, dass das Milchersatzmittel einen Fettanteil aufweist, wobei insbesondere 90% als Triglyzeride, 10% als Mono- und Diglyzeride vorliegen.
- 25 38. Spezialnahrung nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, dass der Fettanteil Distelöl und/oder Sojaöl und/oder Kokosöl umfasst.

39. Spezialnahrung nach einem der Ansprüche 28 bis 38, dadurch gekennzeichnet, daß das Milchersatzmittel als Milchmixgetränk, insbesondere Fruchtmilchmixgetränk oder Kakao ausgebildet ist.

5

40. Phenylalaninarmes Spezialnahrungsmittel, enthaltend ein proteinarmes Grundnahrungsmittel sowie wenigstens eine Verbindung mit folgender allgemeiner Formel:

10



worin R1 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH,  
SH, F, Cl, Br, I, NH<sub>2</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub>; NH-Acyl,  
wobei der Acylrest 1 bis 32 Kohlenstoffatome enthält,  
insbesondere CH<sub>3</sub>O, bevorzugt 9 bis 32, vorzugsweise 9 bis  
20 Kohlenstoffatome, enthält;

15

worin R2 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH,  
SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, O, S;

20

worin R3 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>,  
C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>;

worin R4 und R6 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus  
der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I,  
Acetyl, OX, wobei X ein C1 bis C32 Acylrest, insbesondere

ein C9 bis C32 Acylrest, bevorzugt ein C9 bis C20 Acylrest, ist;

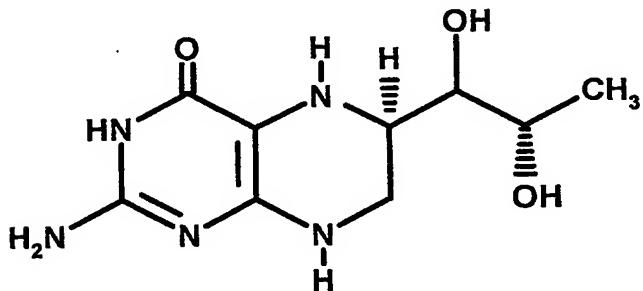
worin R5 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: Phenyl, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl, Isobutyl, t-Butyl;

5 worin R7 und R8 unabhängig voneinander ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, CH<sub>3</sub>, COOH, CHO, COOR<sub>9</sub>, wobei R9 CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl ist;

worin R10 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, und -- eine optionale Doppelbindung darstellt; sowie

10 deren lebensmitteltechnisch akzeptablen Salze.

41. Phenylalaninarmes Spezialnahrungsmittel nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass sie wenigstens eine Verbindung enthält, welche ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin, Sapropterin, insbesondere dessen Hydrochlorid, sowie einer Verbindung mit folgender Struktur:



(-)-(1'R,2'S,6R)-2-Amino-6-(1',2'-dihydroxypropyl)-5,6,7,8-tetrahydro-4(3H)-pteridinone,

insbesondere deren Dihydrochlorid oder Sulfat und/oder

25 2-N-Stearoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder 2-N-Decanoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder

2-N-Palmitoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; und/oder  
2-N-Linoleoyl-1',2'-di-O-acetyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin.

42. Phenylalaninarmes Spezialnahrungsmittel nach Anspruch 40

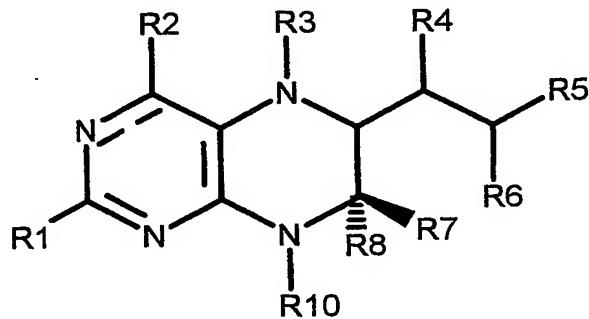
5

oder 41, dadurch gekennzeichnet, daß es ausgewählt ist aus:  
Fertiggerichte; Teigwaren, insbesondere Nudeln; Backwaren,  
insbesondere Brot, Kuchen, Kekse; Süßwaren, insbesondere  
Schokolade, Bonbons, Eis; Getränke, insbesondere  
Milchersatzmittel, ausgebildet als Milchmixgetränk, insbesondere  
als Fruchtmilchmixgetränk oder Kakao; sowie Bier.

10

43. Diagnostikum zur Diagnose von Tetrahydrobiopterin-Sensitivität  
bei Erkrankungen des Aminosäurestoffwechsels einhergehen,  
enthaltend wenigstens eine Verbindung mit folgender  
allgemeiner Formel:

15



20

worin R1 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH,  
SH, F, Cl, Br, I, NH<sub>2</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, N(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub>; NH-Acyl,  
wobei der Acylrest 1 bis 32 Kohlenstoffatome enthält,  
insbesondere CH<sub>3</sub>O, bevorzugt 9 bis 32, vorzugsweise 9 bis  
20 Kohlenstoffatome, enthält;

- worin R2 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, OH,  
SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, O, S;
- worin R3 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>,  
C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>;
- 5 worin R4 und R6 unabhängig voneinander ausgewählt werden aus  
der Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I,  
Acetyl, OX, wobei X ein C1 bis C32 Acylrest, insbesondere  
ein C9 bis C32 Acylrest, bevorzugt ein C9 bis C20 Acylrest,  
ist;
- 10 worin R5 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: Phenyl,  
CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl, Isobutyl, t-Butyl;
- worin R7 und R8 unabhängig voneinander ausgewählt wird aus der  
Gruppe bestehend aus: H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, CH<sub>3</sub>,  
COOH, CHO, COOR9, wobei R9 CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, Butyl ist;
- 15 worin R10 ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus: H, CH<sub>3</sub>,  
C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, und - - eine optionale Doppelbindung darstellt;  
insbesondere 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin; sowie deren  
pharmazeutisch akzeptablen Salze.
- 20 44. Verwendung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die  
Zustände umfassen: Phenylketonurie, insbesondere milde Phenylketonurie,  
klassische Phenylketonurie; Pigmentstörungen der Haut, insbesondere  
Vitiligo; sowie Zustände bedingt durch verminderte zelluläre Verfügbarkeit  
von Katecholaminen, insbesondere orthostatische Hypotension (Shy-Drager  
25 Syndrom), muskuläre Dystonie; sowie Neurotransmitterstörungen,  
insbesondere Schizophrenie; Zustände bedingt durch verminderte zelluläre  
Verfügbarkeit von Dopamin oder Serotonin als Folge von  
Tyrosinhydroxylase- oder Tryptophanhydroxylasemangel, insbesondere  
Parkinsonismus, depressive Erkrankungen sowie dystone

Bewegungsstörungen, Zustände mit verminderter NO-Synthaseaktivität, insbesondere endotheliale Dysfunktion, mangelnde Infektabwehr.

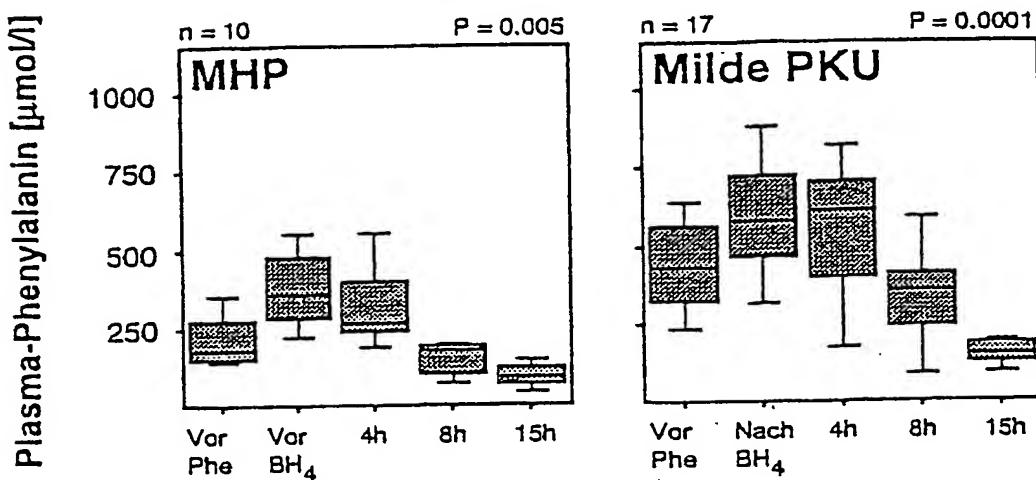
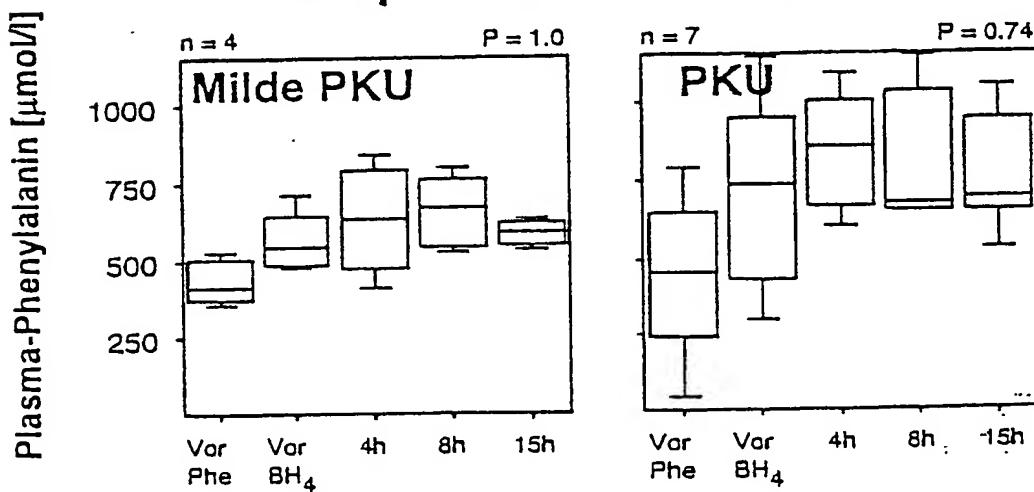
**BH<sub>4</sub> - sensitiv****BH<sub>4</sub> - nicht sensitiv**

Fig. 1

2.1 / 5

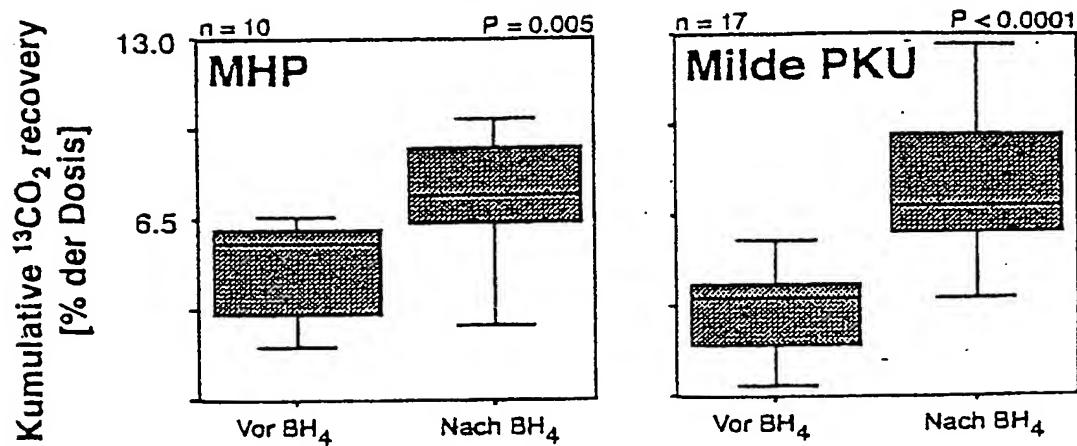
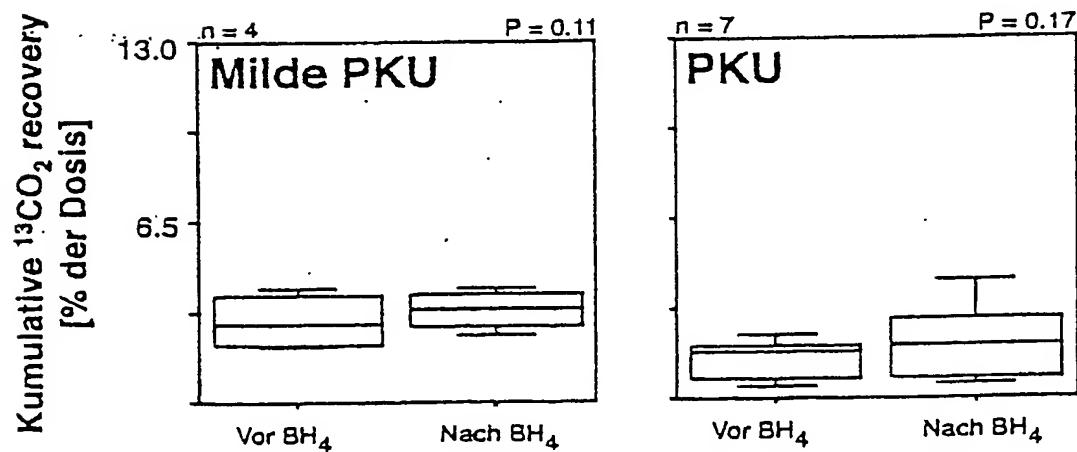
**A****BH<sub>4</sub> - sensitiv****BH<sub>4</sub> - nicht sensitiv**

Fig. 2

2.2/5

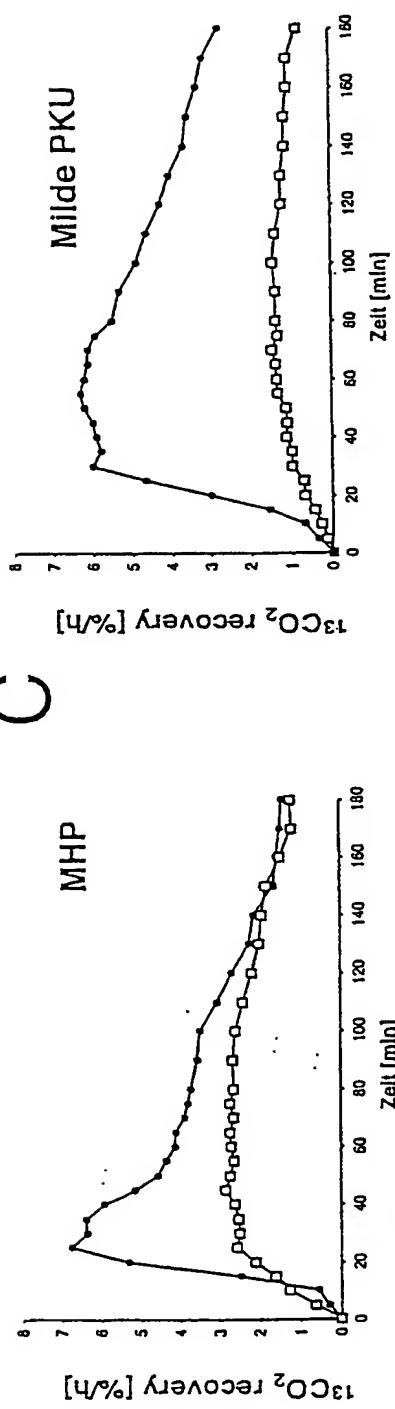
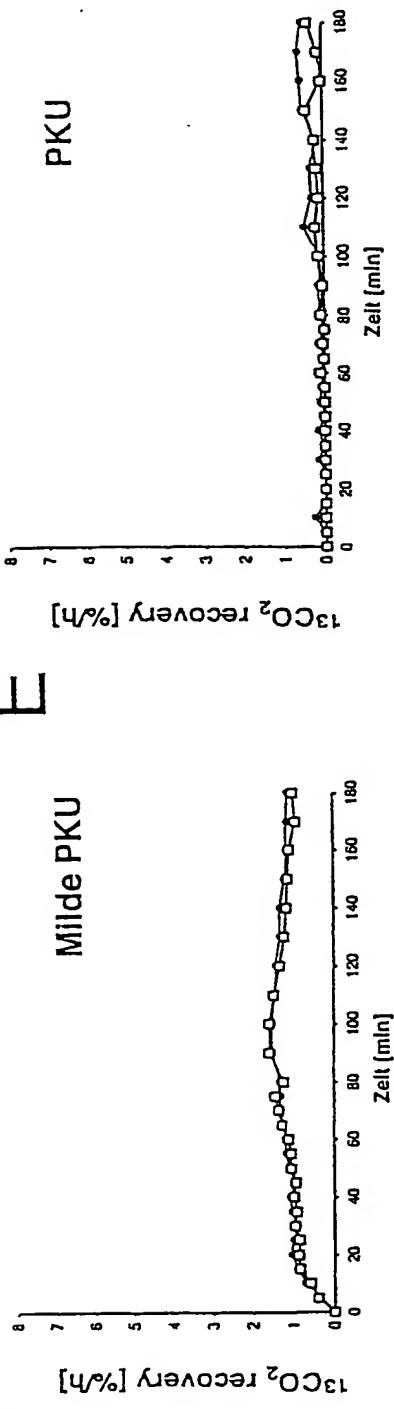
**BH<sub>4</sub> - sensitiv****C****B****BH<sub>4</sub> - nicht sensitiv****D****E**

Fig. 2 Fortsetzung

3 / 5

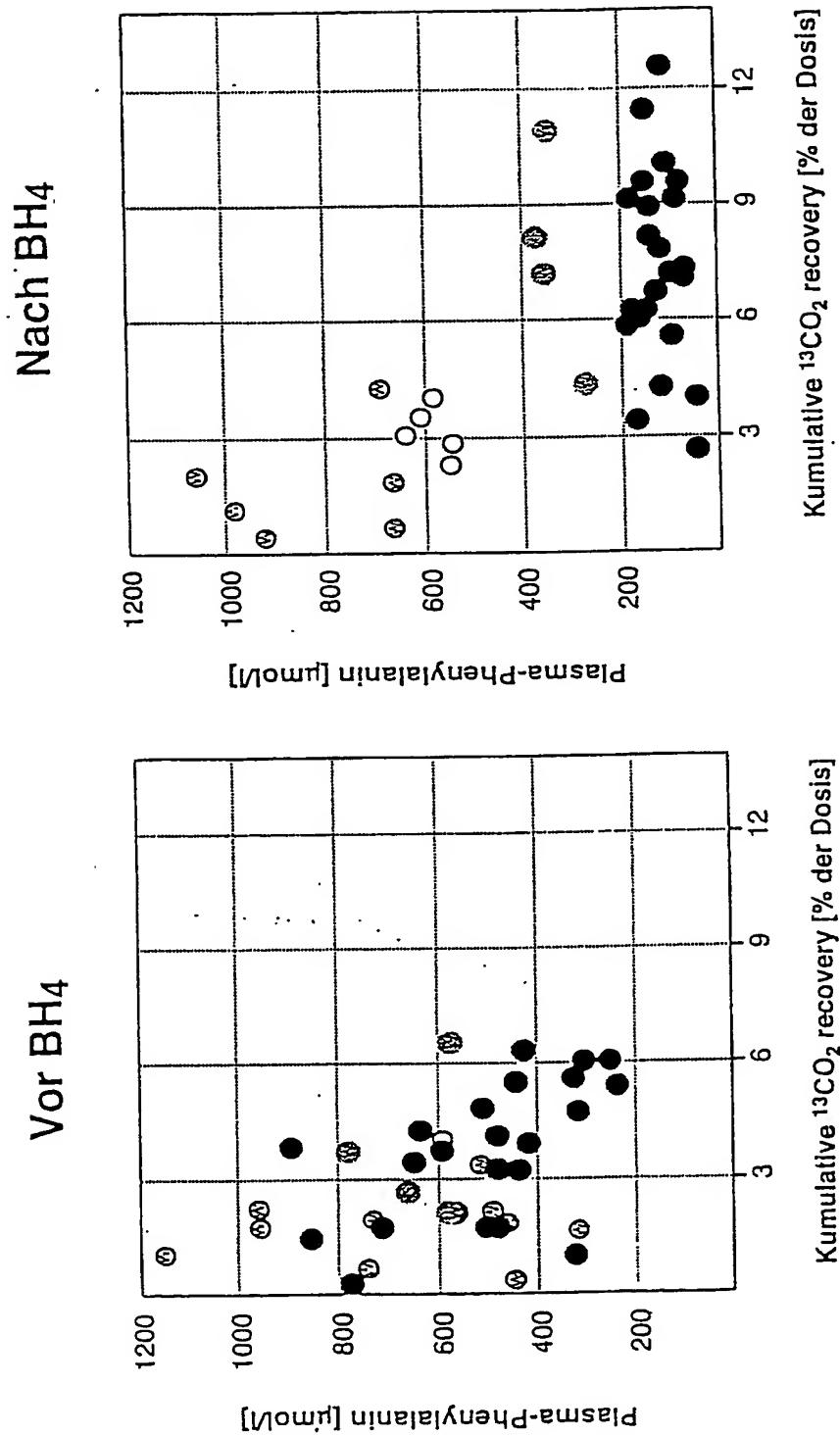


Fig. 3

4 / 5

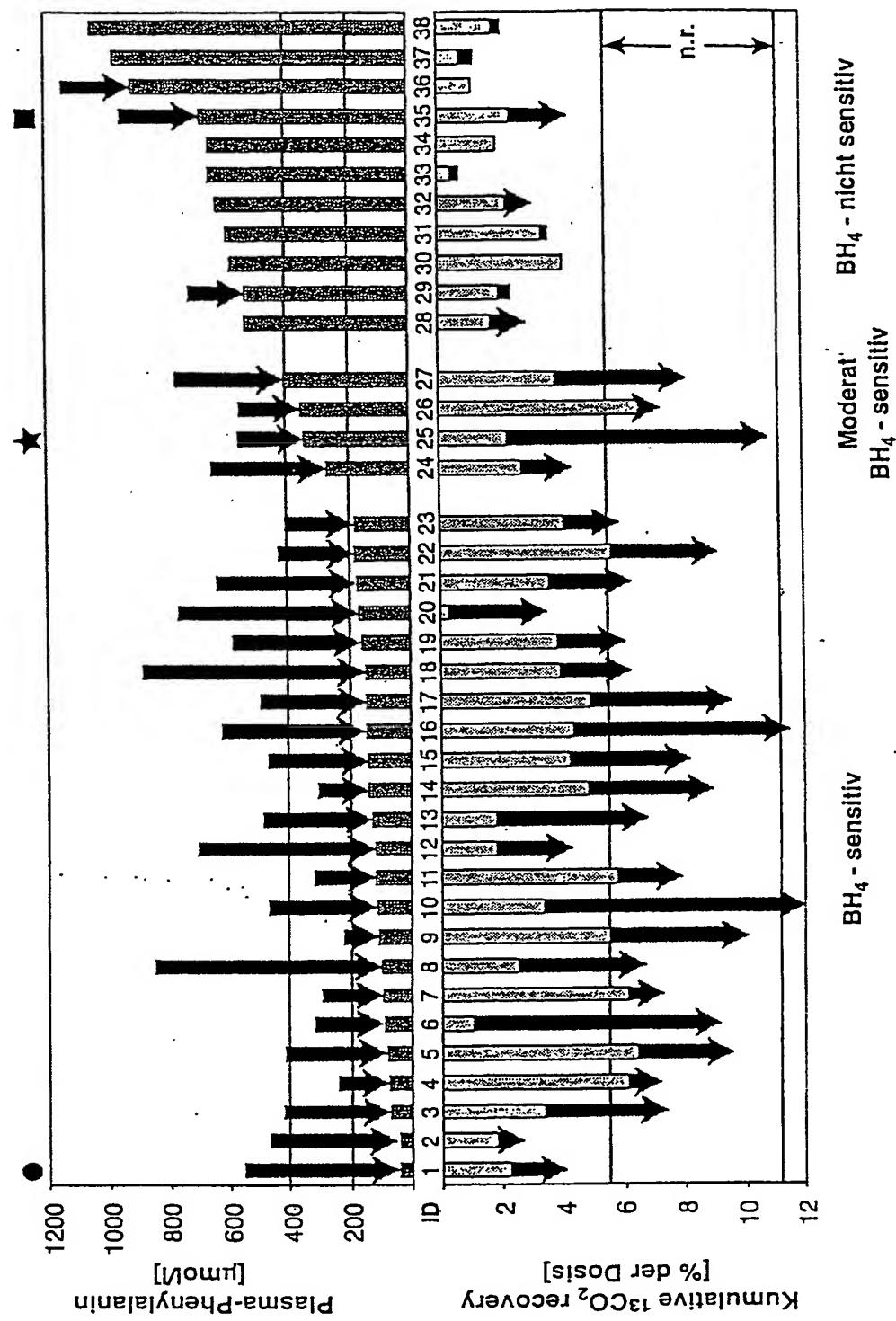


Fig. 4

5 / 5

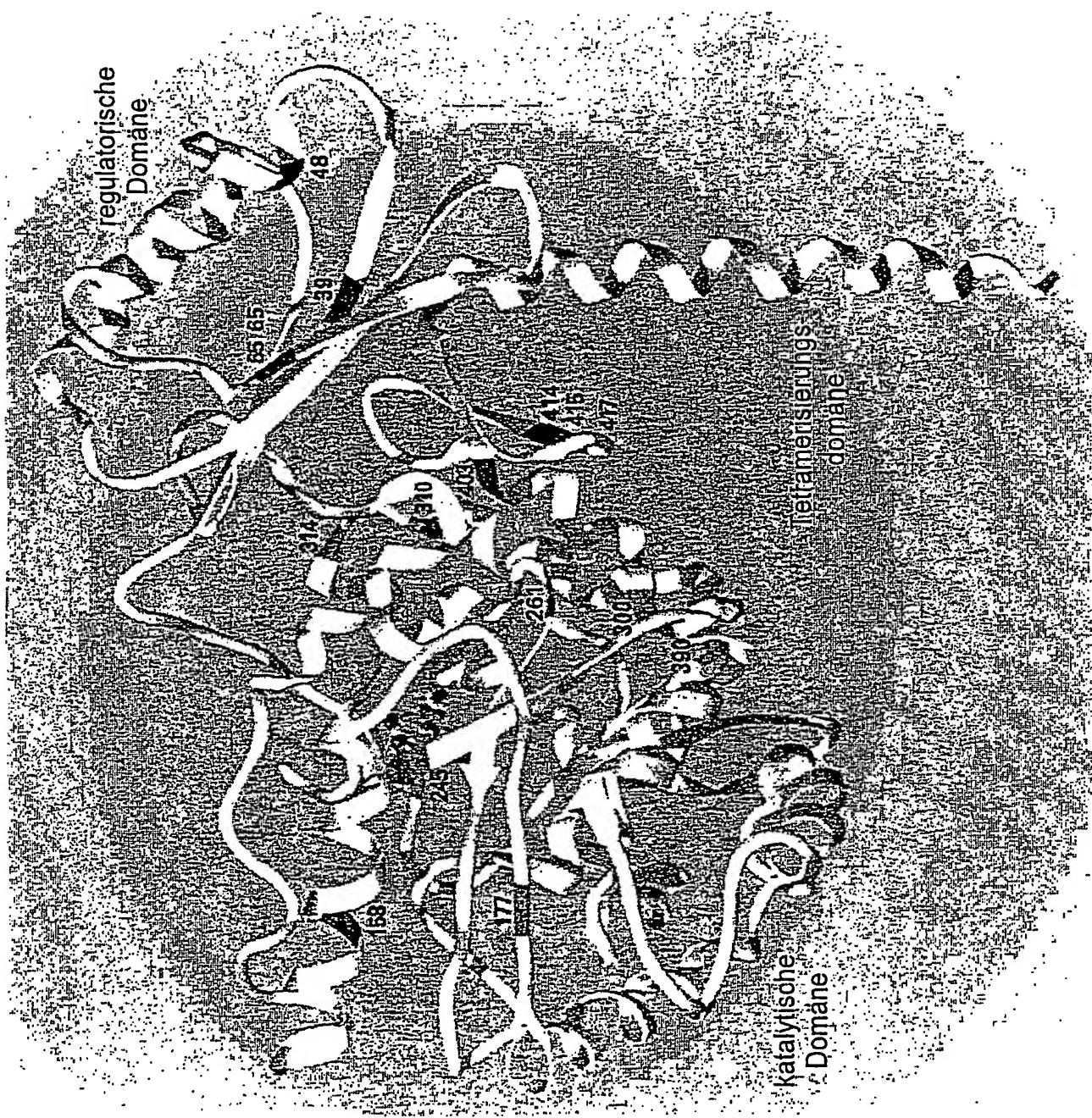


Fig. 5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**